

Universidade do Minho
Escola de Ciências

António José Felgueiras Castro

**Modelação Molecular de péptidos
com potencial imunogénico em
membranas lipídicas**



Universidade do Minho

Escola de Ciências

António José Felgueiras Castro

**Modelação Molecular de péptidos
com potencial imunogénico em
membranas lipídicas**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho realizado sob orientação do
Professor Doutor Nuno Miguel da Silva Micaêlo
e co-orientação da
Professora Maria Elisabete C. Dias Real Oliveira
e da
**Professora Ana Paula Fernandes Monteiro
Sampaio Carvalho**

Julho 2013

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, ____/____/____

Assinatura: _____

Agradecimentos

Ao Doutor Nuno Micaêlo pela orientação, disponibilidade e tempo dedicado e por todos os conhecimentos transmitidos.

Às Doutoras Elisabete Oliveira e Ana Paula Sampaio pela disponibilidade e apoio prestado.

À família pelo apoio incondicional com o qual sempre pude contar.

Aos amigos, cuja amizade serviu muitas vezes de refúgio.

Resumo

Modelação Molecular de péptidos com potencial imunogénico em membranas lipídicas

O uso de lipossomas como portadores de biomoléculas, apresenta-se como um marco importante na produção de vacinas ou de sistemas *drug-delivery*, usados para libertação controlada de fármacos, de marcadores para diagnóstico, entre outras aplicações. Na sua aplicação em vacinas, o uso de lipossomas apresenta a vantagem de conseguir manter antigénios (p.e. material nucleico ou pequenos péptidos) presentes no organismo o tempo suficiente para se obter uma resposta imunológica. De outra forma estas biomoléculas degradam-se facilmente, ou são removidas do organismo via sistema circulatório ou linfático, podendo não haver tempo suficiente para se obter uma resposta imunológica. Neste contexto foi estudada a interação de alguns péptidos correspondentes a epítomos de proteínas da parede celular da *Candida albicans* em bicamadas lipídicas, recorrendo a métodos de Dinâmica Molecular. Foram utilizados 4 péptidos diferentes, provenientes das proteínas *Enolase* (Enol), *Phosphoglycerate kinase* (Pgk1), *Methyltetrahydropteroyltriglutamate* (Met6) e *Fructose-bisphosphate aldolase* (Fba), expressas na parede de *C. albicans* no decurso de uma candidíase disseminada. Nesta tese, foi estudada a interação destes péptidos com uma membrana lipídica neutra.

Os resultados obtidos sugerem que o péptido Enol se localiza preferencialmente no domínio apolar da membrana, onde apresenta uma maior estabilização da sua estrutura. Os péptidos Pgk1, Met6 e Fba, localizam-se preferencialmente na interface entre os domínios polar e apolar da membrana, onde se verifica uma maior estabilização da estrutura dos péptidos. O estudo da energia livre do processo de inserção dos diferentes péptidos em membrana sugere, que a inserção dos diferentes péptidos em membrana é favorecida em todos os casos. O péptido Enol apresenta uma maior afinidade com a membrana em relação aos outros péptidos estudados. O Met6 é o péptido com menor afinidade à membrana, apresentando um perfil de energia com um declive suave, que sugere que o processo de inserção em membrana é facilmente reversível. A maior afinidade do péptido Enol com a membrana é um fator vantajoso no desenvolvimento de vacinas baseadas no uso de lipossomas, porque previne a sua libertação espontânea e eliminação precoce.

Abstract

Molecular Modeling of peptides with immunogenic potential in lipid membranes

The use of liposomes as carriers of biomolecules is an important step in vaccine production, drug-delivery systems, controlled release of drugs or as carriers of diagnostic markers, among other applications. The use of liposomes in vaccines has the advantage of retaining the antigens (i.e. nucleic material or small peptides) in the host organism long enough to get an immune response. Otherwise, these biomolecules will degrade easily, or be removed from the body via the lymphatic or circulatory system, and may not be retained enough time to generate an immune response. In this context, we studied the interaction of several peptides corresponding to epitopes of proteins from the cell wall of *Candida albicans* in lipid bilayers, using molecular dynamics methods. We used four different peptides, obtained from the proteins Enolase (Enol), Phosphoglycerate kinase (Pgk1), Methyltetrahydropteroyltriglutamate (Met6) and Fructose-bisphosphate aldolase (Fba) expressed on the wall of *Candida albicans* during disseminated candidiasis. In this thesis we studied the interaction of these peptides with a neutral lipid membrane.

The results suggest that the peptide Enol is located preferably in the apolar domain of the membrane, showing a higher stabilization of the structure. The peptides Pgk1, Met6 and Fba are preferentially located at the interface between the polar and apolar domains of the membrane, where there is a greater stabilization of the peptides structure. The peptide insertion free energy profile across the membrane, suggests that the peptide membrane insertion is favored in all cases. Enol peptide has a higher affinity for the membrane relative to other peptides studied. The Met6 peptide has the lowest membrane affinity, exhibiting an energy profile with a gentle slope, suggesting that the membrane-insertion process is easily reversible. The higher affinity of the Enol peptide with the membrane is an advantageous factor in the development of vaccines based on the use of liposomes, because it prevents leaking and early elimination.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Lista de abreviaturas	xi
Índice de figuras	xiii
Índice de tabelas	xvii
1. Introdução.....	1
1.1. Mecanismos de resposta imunitária	3
1.2. Vacinas baseadas em subunidades de patógenos	6
1.2.1. Propriedades adjuvantes dos lipossomas	9
1.3. Desenvolvimento de estratégias imunoprotetoras contra <i>Candida albicans</i> baseada em sistemas lipossomais	11
1.3.1. Mecanismos de ação patogénica da <i>Candida albicans</i>	11
1.3.2. Estratégias imunoprotetoras baseadas em subunidades	13
1.3.2.1. Uso de lipossomas para o desenvolvimento de estratégias imunoprotetoras baseadas em subunidades	14
1.4. Modelação Molecular	16
1.4.1. Campos de força empíricos	16
1.4.1.1. Interações ligantes	17
1.4.1.1.1. Ligações	17
1.4.1.1.2. Ângulo de ligação	19
1.4.1.1.3. Diedros	20
1.4.1.2. Interações não ligantes	22
1.4.1.2.1. Interações eletrostáticas	22
1.4.1.2.2. Interações de van der Waals	23
1.4.1.3. Solvatação	24
1.4.2. Minimização de energia	25
1.4.3. Condições fronteira periódicas	27
1.4.3.1. Tratamento de interações não ligantes	28
1.4.3.2. Particle Mesh Ewald	29
1.4.4. Dinâmica Molecular	32

1.4.4.1. Leapfrog	32
1.4.4.2. Controlo de temperatura e pressão.....	33
1.4.5. Potencial de Força Média.....	35
2. Material e métodos	37
2.1. Modelos Moleculares.....	39
2.1.1. Modelos de péptidos.....	39
2.1.2. Modelos de membranas	40
2.1.3. Sistemas	42
2.1.4. Dinâmica Molecular	44
2.1.5. Potencial de força média.....	46
3. Análise de Resultados	49
3.1.1. PMF	63
3.1.2. Ligações de Hidrogénio	69
3.1.3. Análise conformacional.....	76
3.2. Simulações de Dinâmica molecular.....	82
3.2.1. Localização dos péptidos em membrana	91
3.2.2. Ligações de Hidrogénio	93
3.2.3. Superfície Acessível ao Solvente	96
4. Conclusão:.....	103
5. Bibliografia	107

Lista de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ala	Alanina
APC	<i>Antigen presenting cell</i>
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
DDA	<i>Dimethyldioctadecylammonium</i>
DODAB	<i>Dioctadecyldimethylammonium bromide</i>
DSPC	<i>1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>
Enol	<i>Enolase</i>
ESP	<i>Eletrostatic Potential</i>
Fba	<i>Fructose-bisphosphate aldolase</i>
FCA	<i>Freund's Complete Adjuvant</i>
GA	Grupo apolar
Gap1	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutâmico
Gly	glicina
GP	Grupo polar
Hwp1	<i>Hyphal wall protein 1</i>
IgE	Imunoglobulina E
Ile	Isoleucina
ISCOM	<i>Immunostimulating complex</i>
ISCOMATRIX	<i>Immunostimulating complex matrix</i>
Leu	Leucina
LINCS	<i>Linear Constraint Solver for Molecular Simulations</i>
Lys	Lisina

Met6	<i>Methyltetrahydropteroyltriglutamate</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PME	<i>Particle mesh Ewald</i>
PPM	<i>Particle-particle particle-mesh</i>
Pgk1	<i>Phosphoglycerate kinase</i>
Phe	Fenilalanina
PMF	<i>Potential of mean force</i>
Pro	Prolina
RESP	<i>Restrained Eletrostatic Potential</i>
RMSD	<i>Root mean square deviation</i>
S	Meio aquoso
SAS	Superfície acessível ao solvente
Ser	serina
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
TDB	<i>Trehalose 6,6'-dibehenate</i>
Thr	Treonina
TLRs	<i>Toll like receptors</i>
Tyr	Tirosina
Val	Valina
VIH	Vírus de imunodeficiência humana
WHAM	<i>Weighted histogram analysis method</i>

Índice de figuras

FIGURA 1 – MECANISMOS DE AÇÃO IMUNITÁRIA	3
FIGURA 2 – MECANISMOS DE AÇÃO DE LIPOSSOMAS COMO ADJUVANTES	9
FIGURA 3 - POTENCIAL DE LIGAÇÃO ENTRE DOIS ÁTOMOS (A E B) USANDO UMA RESTRIÇÃO HARMÓNICA (ADAPTADO DE BERK HESS, DAVID VAN DER SPOEL, ERIK LINDAHL ET AL. 2010)	18
FIGURA 4 - POTENCIAL DO ÂNGULO DE LIGAÇÃO ENTRE TRÊS ÁTOMOS (A, B E C) USANDO UMA RESTRIÇÃO HARMÓNICA	19
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DE UM DIEDRO	20
FIGURA 6 - PERFIL DO POTENCIAL DO DIEDRO PARA UMA LIGAÇÃO DUPLA ENTRE OS ÁTOMOS B E C (ADAPTADO DE BERK HESS, DAVID VAN DER SPOEL, ERIK LINDAHL ET AL. 2010).....	21
FIGURA 7 - EXEMPLO DE UMA VIBRAÇÃO FORA DO PLANO FORMADO PELOS ÁTOMOS A B E C.....	21
FIGURA 8 - POTENCIAL DE LENNARD-JONES (ADAPTADO DE BERK HESS, DAVID VAN DER SPOEL, ERIK LINDAHL ET AL. 2010).	23
FIGURA 9 - EXEMPLO DE ALGUMAS GEOMETRIAS POSSÍVEIS PARA A CÉLULA UNITÁRIA (ADAPTADO DE BERK HESS, DAVID VAN DER SPOEL, ERIK LINDAHL ET AL. 2010).....	27
FIGURA 10 - USO DE <i>CUT-OFF</i> E <i>MINIMUM IMAGE CONVENTION</i> . AS INTERAÇÕES NÃO LIGANTES SÓ SÃO CONSIDERADAS PARA PARTÍCULAS ATÉ UMA DISTÂNCIA R_c	28
FIGURA 11 - COMPONENTES DA ADIÇÃO DE EWALD PARA A UMA DIMENSÃO PARA CARGAS PONTUAIS. NA FIGURA ESTÃO REPRESENTADAS AS CARGAS PONTUAIS, POR LINHAS VERTICAIS E AS DISTRIBUIÇÕES GAUSSIANAS (ADAPTADO DE TOUKMAJI A. Y., BOARD J. A. JR 1996).....	30
FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO DO MÉTODOS <i>PARTICLE-MESH</i> . (I) SISTEMA COM PARTÍCULAS CARREGADAS. (II) INTERPOLAÇÃO DAS CARGAS PARA UMA GRELHA. (III) O POTENCIAL E FORÇAS SÃO CALCULADOS PARA OS CENTROS GEOMÉTRICOS DA GRELHA. (IV) O POTENCIAL E AS FORÇAS SÃO USADAS PARA CALCULA AS NOVAS POSIÇÃO DAS PARTÍCULAS (ADAPTADO DE TOUKMAJI A. Y., BOARD J. A. JR 1996).....	31
FIGURA 13: REPRESENTAÇÃO DO MÉTODO DE INTEGRAÇÃO <i>LEAPFROG</i> , AS POSIÇÕES E VELOCIDADES SÃO CALCULADAS COM UMA DIFERENÇA DE FASE DE $\Delta t/2$	33
FIGURA 14 – MODELOS DOS DIFERENTES PÉPTIDOS CRIADOS A PARTIR DE ESTRUTURAS DE REFERÊNCIA OBTIDAS POR RAIOS-X. A ESTRUTURA SECUNDÁRIA PODE SER VISUALIZADA PELA REPRESENTAÇÃO EM <i>CARTOON</i> . OS ÁTOMOS E LIGAÇÕES ESTÃO REPRESENTADOS EM <i>STICKS</i> , USANDO PARA OS DIFERENTES ÁTOMOS O SEGUINTE CÓDIGO DE CORES: VERDE = CARBONO; AZUL = NITROGÊNIO; VERMELHO = OXIGÊNIO. OS ÁTOMOS DE HIDROGÊNIO FORAM OMITIDOS NESTAS REPRESENTAÇÕES.....	39
FIGURA 15 - MEMBRANA DE MONOOLEÍNA COMPOSTA POR UM TOTAL DE 170 LÍPIDOS IGUALMENTE DISTRIBUÍDOS NAS DUAS MONOCAMADAS, SOLVATADA POR 3326 MOLÉCULAS DE ÁGUA APÓS UMA SIMULAÇÃO DE EQUILIBRAÇÃO.....	41
FIGURA 16 - SISTEMAS UTILIZADOS PARA O ESTUDO DA INSERÇÃO DOS DIFERENTES PÉPTIDOS EM MEMBRANA.....	42
FIGURA 17 - EXEMPLOS DOS SISTEMAS UTILIZADOS: (A) PÉPTIDO EM ÁGUA, (B) PÉPTIDO Á SUPERFÍCIE DA MEMBRANA LIPÍDICA, (C) PÉPTIDO INSERIDO NA MEMBRANA.....	43
FIGURA 18 - PROCEDIMENTO USADO EM SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR	44
FIGURA 19 – APLICAÇÃO DE UM POTENCIAL HARMÓNICO NO CENTRO DE MASSA DO PÉPTIDO APLICADO NA DIREÇÃO DO CENTRO GEOMÉTRICO DA MEMBRANA (REPRESENTADO PELA SETA AZUL) E NO SENTIDO OPOSTO ATÉ A SUA COMPLETA REMOÇÃO A MEMBRANA (REPRESENTADO PELA SETA VERMELHA)	47
FIGURA 20 - REPRESENTAÇÃO DE <i>FRAMES</i> DE DIFERENTES JANELAS USADAS NO CÁLCULO DO PFM DA INSERÇÃO DO PÉPTIDO ENOL NA MEMBRANA DE MONOOLEÍNA, USANDO A TÉCNICA DE <i>UMBRELLA SMPLING</i> . ESTÃO REPRESENTADOS AS <i>FRAMES</i> PARA DIFERENTES DISTÂNCIAS ENTRE O CENTRO DE MASSA DA MEMBRANA E DO PÉPTIDO (D_{CM}). (A) D_{CM} : -1.5 NM; (B) D_{CM} : -2.5 NM; (C) D_{CM} : -4 NM (D); D_{CM} : 1.5 NM; (E) D_{CM} : 2.5 NM; (F) D_{CM} : 4 NM.....	52
FIGURA 21 - REPRESENTAÇÃO DE <i>FRAMES</i> DE DIFERENTES JANELAS USADAS NO CÁLCULO DO PFM DA INSERÇÃO DO PÉPTIDO FBA NA MEMBRANA DE MONOOLEÍNA, USANDO A TÉCNICA DE <i>UMBRELLA SMPLING</i> . ESTÃO REPRESENTADOS AS <i>FRAMES</i> PARA	

DIFERENTES DISTÂNCIAS ENTRE O CENTRO DE MASSA DA MEMBRANA E DO PÉPTIDO (D_{CM}). (A) D_{CM} : 1.5 NM; (B) D_{CM} : 2.5 NM; (C) D_{CM} : 4 NM.	55
FIGURA 22 - REPRESENTAÇÃO DE <i>FRAMES</i> DE DIFERENTES JANELAS USADAS NO CÁLCULO DO PFM DA INSERÇÃO DO PÉPTIDO MET6 NA MEMBRANA DE MONOLEÍNA, USANDO A TÉCNICA DE <i>UMBRELLA SMPLING</i> . ESTÃO REPRESENTADOS AS <i>FRAMES</i> PARA DIFERENTES DISTÂNCIAS ENTRE O CENTRO DE MASSA DA MEMBRANA E DO PÉPTIDO (D_{CM}). (A) D_{CM} : 1.5 NM; (B) D_{CM} : 2.5 NM; (C) D_{CM} : 4 NM.	58
FIGURA 23 - REPRESENTAÇÃO DE <i>FRAMES</i> DE DIFERENTES JANELAS USADAS NO CÁLCULO DO PFM DA INSERÇÃO DO PÉPTIDO PGK1 NA MEMBRANA DE MONOLEÍNA, USANDO A TÉCNICA DE <i>UMBRELLA SMPLING</i> . ESTÃO REPRESENTADOS AS <i>FRAMES</i> PARA DIFERENTES DISTÂNCIAS ENTRE O CENTRO DE MASSA DA MEMBRANA E DO PÉPTIDO (D_{CM}). (A) D_{CM} : 1.5 NM; (B) D_{CM} : 2.5 NM; (C) D_{CM} : 4 NM.	62
FIGURA 24 - PERFIL DE ENERGIA LIVRE DO PÉPTIDO ENOL EM FUNÇÃO DA DISTÂNCIA ENTRE O CENTRO DE MASSA DA MEMBRANA E DO PÉPTIDO (D_{CM}) AO LONGO DA COORDENADA DE REAÇÃO Z. ESTÃO MARCADAS ÁREAS CORRESPONDENTES AOS DIFERENTES AMBIENTES ENCONTRADOS NO SISTEMA: O MEIO AQUOSO, POPULADO POR APENAS MOLÉCULAS DE ÁGUA (S), O GRUPO POLAR DOS LÍPIDOS QUE FORMAM A MEMBRANA (GP) E A PARTE DO SISTEMA ONDE PREDOMINA O GRUPO APOLAR DA MEMBRANA (GA).	63
FIGURA 25 - PERFIL DE ENERGIA LIVRE DO PÉPTIDO FBA EM FUNÇÃO DA DISTÂNCIA ENTRE O CENTRO DE MASSA DA MEMBRANA E DO PÉPTIDO (D_{CM}) AO LONGO DA COORDENADA DE REAÇÃO Z. ESTÃO MARCADAS ÁREAS CORRESPONDENTES AOS DIFERENTES AMBIENTES ENCONTRADOS NO SISTEMA: O MEIO AQUOSO, POPULADO POR APENAS MOLÉCULAS DE ÁGUA (S), O GRUPO POLAR DOS LÍPIDOS QUE FORMAM A MEMBRANA (GP) E A PARTE DO SISTEMA ONDE PREDOMINA O GRUPO APOLAR DA MEMBRANA (GA).	65
FIGURA 26 - PERFIL DE ENERGIA LIVRE DO PÉPTIDO MET6 EM FUNÇÃO DA DISTÂNCIA ENTRE O CENTRO DE MASSA DA MEMBRANA E DO PÉPTIDO (D_{CM}) AO LONGO DA COORDENADA DE REAÇÃO Z. ESTÃO MARCADAS ÁREAS CORRESPONDENTES AOS DIFERENTES AMBIENTES ENCONTRADOS NO SISTEMA: O MEIO AQUOSO, POPULADO POR APENAS MOLÉCULAS DE ÁGUA (S), O GRUPO POLAR DOS LÍPIDOS QUE FORMAM A MEMBRANA (GP) E A PARTE DO SISTEMA ONDE PREDOMINA O GRUPO APOLAR DA MEMBRANA (GA).	66
FIGURA 27 - PERFIL DE ENERGIA LIVRE DO PÉPTIDO PGK1 EM FUNÇÃO DA DISTÂNCIA ENTRE O CENTRO DE MASSA DA MEMBRANA E DO PÉPTIDO (D_{CM}) AO LONGO DA COORDENADA DE REAÇÃO Z. ESTÃO MARCADAS ÁREAS CORRESPONDENTES AOS DIFERENTES AMBIENTES ENCONTRADOS NO SISTEMA: O MEIO AQUOSO, POPULADO POR APENAS MOLÉCULAS DE ÁGUA (S), O GRUPO POLAR DOS LÍPIDOS QUE FORMAM A MEMBRANA (GP) E A PARTE DO SISTEMA ONDE PREDOMINA O GRUPO APOLAR DA MEMBRANA (GA).	68
FIGURA 28 – CRITÉRIO GEOMÉTRICO UTILIZADO PARA AVALIAR AS LIGAÇÕES DE HIDROGÉNIO. CONSIDERA-SE O ESTABELECIMENTO DE UMA LIGAÇÃO DE HIDROGÉNIO ENTRE UM ÁTOMO DADOR E UM ACEITADOR PARA $R \leq 0,35$ NM E $\angle \leq 30^\circ$	69
FIGURA 29 - NUMERO DE LIGAÇÕES DE HIDROGÉNIO ESTABELECIDAS PARA O SISTEMA COM O PÉPTIDO ENOL EM FUNÇÃO DA DISTÂNCIA ENTRE O CENTRO DE MASSA DA MEMBRANA E DO PÉPTIDO (D_{CM}) AO LONGO DA COORDENADA DE REAÇÃO Z. FOI CALCULADA A MÉDIA DAS LIGAÇÕES PARA INTERVALOS DE 0.2 NM. ESTÃO REPRESENTADAS AS LIGAÇÕES ENTRE O PÉPTIDO E A MEMBRANA (VERMELHO), AS LIGAÇÕES ENTRE O PÉPTIDO E ÁGUA (VERDE) E AS LIGAÇÕES INTERNAS DO PÉPTIDO (AZUL). ESTÃO MARCADAS ÁREAS CORRESPONDENTES AOS DIFERENTES AMBIENTES ENCONTRADOS NO SISTEMA: O MEIO AQUOSO, POPULADO POR APENAS MOLÉCULAS DE ÁGUA (S), O GRUPO POLAR DOS LÍPIDOS QUE FORMAM A MEMBRANA (GP) E A PARTE DO SISTEMA ONDE PREDOMINA O GRUPO APOLAR DA MEMBRANA (GA).	70
FIGURA 30 - NUMERO DE LIGAÇÕES DE HIDROGÉNIO ESTABELECIDAS PARA O SISTEMA COM O PÉPTIDO FBA EM FUNÇÃO DA DISTÂNCIA ENTRE O CENTRO DE MASSA DA MEMBRANA E DO PÉPTIDO (D_{CM}) AO LONGO DA COORDENADA DE REAÇÃO Z. FOI CALCULADA A MÉDIA DAS LIGAÇÕES PARA INTERVALOS DE 0.2 NM. ESTÃO REPRESENTADAS AS LIGAÇÕES ENTRE O PÉPTIDO E A MEMBRANA (VERMELHO), AS LIGAÇÕES ENTRE O PÉPTIDO E ÁGUA (VERDE) E AS LIGAÇÕES INTERNAS DO PÉPTIDO (AZUL). ESTÃO MARCADAS ÁREAS CORRESPONDENTES AOS DIFERENTES AMBIENTES ENCONTRADOS NO SISTEMA: O MEIO AQUOSO, POPULADO POR APENAS MOLÉCULAS DE ÁGUA (S), O GRUPO POLAR DOS LÍPIDOS QUE FORMAM A MEMBRANA (GP) E A PARTE DO SISTEMA ONDE PREDOMINA O GRUPO APOLAR DA MEMBRANA (GA).	71
FIGURA 31 - NUMERO DE LIGAÇÕES DE HIDROGÉNIO ESTABELECIDAS PARA O SISTEMA COM O PÉPTIDO MET6 EM FUNÇÃO DA DISTÂNCIA ENTRE O CENTRO DE MASSA DA MEMBRANA E DO PÉPTIDO (D_{CM}) AO LONGO DA COORDENADA DE REAÇÃO Z. FOI CALCULADA A MÉDIA DAS LIGAÇÕES PARA INTERVALOS DE 0.2 NM. ESTÃO REPRESENTADAS AS LIGAÇÕES ENTRE O PÉPTIDO E A MEMBRANA (VERMELHO), AS LIGAÇÕES ENTRE O PÉPTIDO E ÁGUA (VERDE) E AS LIGAÇÕES INTERNAS DO PÉPTIDO (AZUL). ESTÃO MARCADAS ÁREAS CORRESPONDENTES AOS DIFERENTES AMBIENTES ENCONTRADOS NO SISTEMA: O MEIO AQUOSO,	

POPULADO POR APENAS MOLÉCULAS DE ÁGUA (S), O GRUPO POLAR DOS LÍPIDOS QUE FORMAM A MEMBRANA (GP) E A PARTE DO SISTEMA ONDE PREDOMINA O GRUPO APOLAR DA MEMBRANA (GA).....	73
FIGURA 32 - NUMERO DE LIGAÇÕES DE HIDROGÉNIO ESTABELECIDAS PARA O SISTEMA COM O PÉPTIDO Pgk1 EM FUNÇÃO DA DISTÂNCIA ENTRE O CENTRO DE MASSA DA MEMBRANA E DO PÉPTIDO (D_{CM}) AO LONGO DA COORDENADA DE REAÇÃO Z. FOI CALCULADA A MÉDIA DAS LIGAÇÕES PARA INTERVALOS DE 0.2 NM. ESTÃO REPRESENTADAS AS LIGAÇÕES ENTRE O PÉPTIDO E A MEMBRANA (VERMELHO), AS LIGAÇÕES ENTRE O PÉPTIDO E ÁGUA (VERDE) E AS LIGAÇÕES INTERNAS DO PÉPTIDO (AZUL). ESTÃO MARCADAS ÁREAS CORRESPONDENTES AOS DIFERENTES AMBIENTES ENCONTRADOS NO SISTEMA: O MEIO AQUOSO, POPULADO POR APENAS MOLÉCULAS DE ÁGUA (S), O GRUPO POLAR DOS LÍPIDOS QUE FORMAM A MEMBRANA (GP) E A PARTE DO SISTEMA ONDE PREDOMINA O GRUPO APOLAR DA MEMBRANA (GA).....	74
FIGURA 33 - RMSD DOS CA DO PÉPTIDO Enol EM FUNÇÃO DA DISTÂNCIA ENTRE O CENTRO DE MASSA DA MEMBRANA E DO PÉPTIDO (D_{CM}) AO LONGO DA COORDENADA DE REAÇÃO Z. ESTÃO MARCADAS ÁREAS CORRESPONDENTES AOS DIFERENTES AMBIENTES ENCONTRADOS NO SISTEMA: O MEIO AQUOSO, POPULADO POR APENAS MOLÉCULAS DE ÁGUA (S), O GRUPO POLAR DOS LÍPIDOS QUE FORMAM A MEMBRANA (GP) E A PARTE DO SISTEMA ONDE PREDOMINA O GRUPO APOLAR DA MEMBRANA (GA).....	76
FIGURA 34 - RMSD DOS CA DO PÉPTIDO Fba EM FUNÇÃO DA DISTÂNCIA ENTRE O CENTRO DE MASSA DA MEMBRANA E DO PÉPTIDO (D_{CM}) AO LONGO DA COORDENADA DE REAÇÃO Z. ESTÃO MARCADAS ÁREAS CORRESPONDENTES AOS DIFERENTES AMBIENTES ENCONTRADOS NO SISTEMA: O MEIO AQUOSO, POPULADO POR APENAS MOLÉCULAS DE ÁGUA (S), O GRUPO POLAR DOS LÍPIDOS QUE FORMAM A MEMBRANA (GP) E A PARTE DO SISTEMA ONDE PREDOMINA O GRUPO APOLAR DA MEMBRANA (GA).....	77
FIGURA 35 - RMSD DOS CA DO PÉPTIDO Met6 EM FUNÇÃO DA DISTÂNCIA ENTRE O CENTRO DE MASSA DA MEMBRANA E DO PÉPTIDO (D_{CM}) AO LONGO DA COORDENADA DE REAÇÃO Z. ESTÃO MARCADAS ÁREAS CORRESPONDENTES AOS DIFERENTES AMBIENTES ENCONTRADOS NO SISTEMA: O MEIO AQUOSO, POPULADO POR APENAS MOLÉCULAS DE ÁGUA (S), O GRUPO POLAR DOS LÍPIDOS QUE FORMAM A MEMBRANA (GP) E A PARTE DO SISTEMA ONDE PREDOMINA O GRUPO APOLAR DA MEMBRANA (GA).....	78
FIGURA 36 - RMSD DOS CA DO PÉPTIDO Pgk1 EM FUNÇÃO DA DISTÂNCIA ENTRE O CENTRO DE MASSA DA MEMBRANA E DO PÉPTIDO (D_{CM}) AO LONGO DA COORDENADA DE REAÇÃO Z. ESTÃO MARCADAS ÁREAS CORRESPONDENTES AOS DIFERENTES AMBIENTES ENCONTRADOS NO SISTEMA: O MEIO AQUOSO, POPULADO POR APENAS MOLÉCULAS DE ÁGUA (S), O GRUPO POLAR DOS LÍPIDOS QUE FORMAM A MEMBRANA (GP) E A PARTE DO SISTEMA ONDE PREDOMINA O GRUPO APOLAR DA MEMBRANA (GA).....	80
FIGURA 37- REPRESENTAÇÃO DO SISTEMA CONTENDO O PÉPTIDO Enol NA MEMBRANA DE MONOLEÍNA. ESTÃO REPRESENTADOS AS FRAMES DOS SISTEMAS: I) PÉPTIDO EM ÁGUA II) PÉPTIDO À SUPERFÍCIE DA MEMBRANA; III) PÉPTIDO INSERIDO NA MEMBRANA APÓS 100 NS DE SIMULAÇÃO.	84
FIGURA 38 - REPRESENTAÇÃO DO SISTEMA CONTENDO O PÉPTIDO Fba NA MEMBRANA DE MONOLEÍNA. ESTÃO REPRESENTADOS AS FRAMES DOS SISTEMAS: I) PÉPTIDO EM ÁGUA II) PÉPTIDO À SUPERFÍCIE DA MEMBRANA; III) PÉPTIDO INSERIDO NA MEMBRANA APÓS 100 NS DE SIMULAÇÃO.	86
FIGURA 39 - REPRESENTAÇÃO DO SISTEMA CONTENDO O PÉPTIDO Met6 NA MEMBRANA DE MONOLEÍNA. ESTÃO REPRESENTADOS AS FRAMES DOS SISTEMAS: I) PÉPTIDO EM ÁGUA II) PÉPTIDO À SUPERFÍCIE DA MEMBRANA; III) PÉPTIDO INSERIDO NA MEMBRANA APÓS 100 NS DE SIMULAÇÃO.	88
FIGURA 40 - REPRESENTAÇÃO DO SISTEMA CONTENDO O PÉPTIDO Pgk1 NA MEMBRANA DE MONOLEÍNA. ESTÃO REPRESENTADOS AS FRAMES DOS SISTEMAS: I) PÉPTIDO EM ÁGUA II) PÉPTIDO À SUPERFÍCIE DA MEMBRANA; III) PÉPTIDO INSERIDO NA MEMBRANA APÓS 100 NS DE SIMULAÇÃO.	90
FIGURA 41 - DISTÂNCIA ENTRE OS CENTROS DE MASSA DOS DIFERENTES PÉPTIDOS E A MEMBRANA PARA OS SISTEMAS CONTENDO O PÉPTIDO INSERIDO NO INTERIOR DA MEMBRANA.....	91
FIGURA 42 - NÚMERO MÉDIO (E O RESPECTIVO DESVIO PADRÃO) DE LIGAÇÕES HIDROGÉNIO ESTABELECIDAS PARA OS VÁRIOS SISTEMAS UTILIZADOS, PÉPTIDO EM ÁGUA (ÁGUA), À SUPERFÍCIE (SUP) E INSERIDO (MEM) EM MEMBRANA. PARA OS DIFERENTES SISTEMAS FORAM AVALIADAS AS LIGAÇÕES PÉPTIDO-MEMBRANA (PEP-MON), PÉPTIDO-ÁGUA (PEP-ÁGUA) E PÉPTIDO-PÉPTIDO (PEP-PEP)	93
FIGURA 43 - VALOR MÉDIO E RESPECTIVO DESVIO PADRÃO DA PERCENTAGEM DE SUPERFÍCIE HIDROFÓBICA ACESSÍVEL AO SOLVENTE PARA OS DIVERSOS PÉPTIDOS NOS TRÊS SISTEMAS ESTUDADOS: PÉPTIDO EM ÁGUA (ÁGUA), PÉPTIDO À SUPERFÍCIE DA MEMBRANA (SUP) E PÉPTIDO INSERIDO NO INTERIOR DA MEMBRANA (MEM)	96

FIGURA 44 - SUPERFÍCIE ACESSÍVEL AO SOLVENTE MÉDIA E RESPETIVO DESVIO PADRÃO DE CADA RESÍDUO DO PÉPTIDO ENOL PARA OS SISTEMAS CONTENDO O PÉPTIDO EM ÁGUA (ÁGUA), PÉPTIDO À SUPERFÍCIE DA MEMBRANA (SUP) E PÉPTIDO INSERIDO NO INTERIOR DA MEMBRANA (MEM)	97
FIGURA 45 - SUPERFÍCIE ACESSÍVEL AO SOLVENTE MÉDIA E RESPETIVO DESVIO PADRÃO DE CADA RESÍDUO DO PÉPTIDO FBA PARA OS SISTEMAS CONTENDO O PÉPTIDO EM ÁGUA (ÁGUA), PÉPTIDO À SUPERFÍCIE DA MEMBRANA (SUP) E PÉPTIDO INSERIDO NO INTERIOR DA MEMBRANA (MEM)	98
FIGURA 46 - SUPERFÍCIE ACESSÍVEL AO SOLVENTE MÉDIA E RESPETIVO DESVIO PADRÃO DE CADA RESÍDUO DO PÉPTIDO MET6 PARA OS SISTEMAS CONTENDO O PÉPTIDO EM ÁGUA (ÁGUA), PÉPTIDO À SUPERFÍCIE DA MEMBRANA (SUP) E PÉPTIDO INSERIDO NO INTERIOR DA MEMBRANA (MEM)	99
FIGURA 47 - SUPERFÍCIE ACESSÍVEL AO SOLVENTE DE CADA RESÍDUO DO PÉPTIDO Pgk1 PARA OS SISTEMAS CONTENDO O PÉPTIDO EM ÁGUA, À SUPERFÍCIE DA MEMBRANA E INSERIDO NA MEMBRANA.	100

Índice de tabelas

TABELA 1 – SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DOS PÉPTIDOS PROPOSTOS PARA ESTUDO	15
--	----

1. Introdução

1.1. Mecanismos de resposta imunitária

A imunidade contra um agente infeccioso pode ser alcançada através de mecanismos de imunidade inata ou mecanismos de imunidade adquirida, Figura 1. A imunidade inata é caracterizada por uma resposta rápida e não específica. Entre os vários mecanismos utilizados encontram-se as secreções mucosas, febre, ação de mediadores químicos e intervenção de células fagocíticas. Este tipo de células contém na sua superfície, vários recetores (PRRs – Pathogen recognition receptors) que permitem o reconhecimento de agentes patogénicos. Na superfície dos agentes patogénicos existem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs - *Pathogen-associated molecular patterns*) que são reconhecidos por esses recetores (Ex: TLRs - *toll like receptors*) existentes nas células do hospedeiro que intervêm na resposta imunitária inata. Para agentes patogénicos do mesmo tipo, existe o mesmo conjunto de recetores, isto confere às células que intervêm na resposta imunitária inata, uma ação rápida, já que não existe nenhum período de espera relacionado com a expansão clonal, tal como acontece com a resposta imunitária adquirida ou adaptativa. Células que intervêm na resposta imunitária inata, como é o caso dos macrófagos e das células dendríticas, para além de eliminarem o organismo intruso por fagocitose, também desempenham o papel de apresentadores de antígenos (APC - *antigen presenting cells*) para a geração de uma resposta imunitária adquirida.

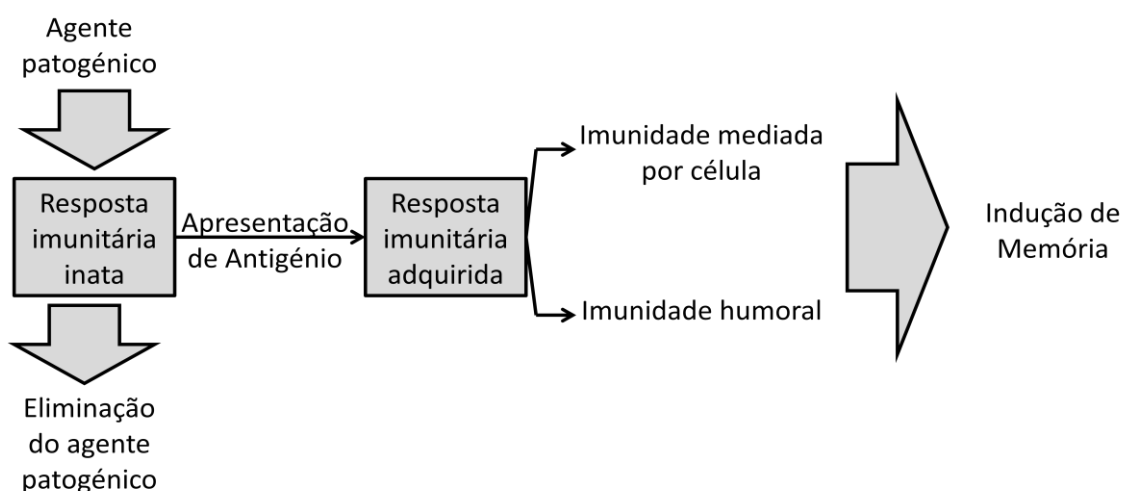


Figura 1 – Mecanismos de ação imunitária

A resposta imunitária adquirida é mediada por linfócitos B e T, atuando de forma específica nos agentes patogénicos. Ao contrário do que acontece com a resposta imunitária inata, este tipo de resposta é mais demorado, no entanto, a sua capacidade de reconhecimento e resposta específica a antígenos e a capacidade de formar memória, faz com que a sua intervenção seja muito mais eficiente. Os antígenos captados pelas APCs podem ser processados em diferentes zonas da célula. Por um lado, os antígenos podem ser fragmentados pelas proteases nos endossomas levando os fragmentos para o complexo principal de histocompatibilidade de classe 2 (MHC II), sendo depois exportados para a membrana da célula e apresentados a receptores específicos dos linfócitos T, ativando linfócitos T auxiliares (CD4). Por outro lado, os antígenos podem ser processados a nível do citosol, sendo neste caso levados para o complexo MHC I. O complexo formado pelo MHC I e o fragmento do antígeno é reconhecido por o linfócitos T citotóxicos (CD8). Células CD4 ativadas podem-se diferenciar em células Th1, Th2 ou Th17 cujo papel é regular a resposta imunitária através da produção de citocinas e da ativação de linfócitos B, APCs, entre outros intervenientes do sistema imunitário. As células Th1 ativam as funções citotóxicas e funções inflamatórias, as células Th2 estimulam a produção de anticorpos em particular as respostas associadas à IgE (imunoglobulina E) e as células Th17 induzem resposta inflamatória aguda com intervenção de neutrófilos. As células CD8 adotam uma função citotóxica, migrando para a região inflamada, eliminando células infetadas com patogénios intracelulares, como é o caso dos vírus e libertam citocinas com a capacidade de retardar a sua replicação. A atuação sobre os agentes patogénicos pode ainda ser feita no espaço extracelular do local de infeção. Os mecanismos de atuação neste espaço constituem o que se chama de resposta imunitária humoral. Neste tipo de resposta intervêm os linfócitos B através da produção de anticorpos que se ligam ao agente patogénico neutralizando-o, posteriormente a eliminação é levada a cabo por células fagocíticas. A ativação dos linfócitos B é feita através da interação de antígenos com os receptores de imunoglobulina presentes na sua superfície e com a interação com as células T auxiliares. As proteínas do sistema do complemento são também extremamente importantes na imunidade humoral pois induzem uma resposta inflamatória, trazendo células fagocíticas para o local de infeção; alguns dos seus fragmentos são opsoninas, facilitando a eliminação dos agentes patogénicos

opsonizados por fagocitose e é capaz de lisar os microrganismos através do complexo de ataque membranar.

Um dos aspectos mais relevantes da resposta imunitária adaptativa é a geração de memória. Esta propriedade permite ao sistema imunitário responder com maior rapidez e eficiência a agentes patogénicos que já tenham contactado o organismo hospedeiro anteriormente. Linfócitos B de memória, não produzem anticorpos, mas na presença do mesmo patógeno, estas células dividem-se e diferenciam-se em células produtoras de anticorpos, os plasmócitos. Os linfócitos T de memória separam-se em dois subconjuntos, células T de memória central e células T de memória efetoras. As células T de memória central apresentam longa duração na ausência de antígeno, o mesmo não acontece com as células efetoras de memória, que podem ser rapidamente ativadas, produzindo citocinas quando estimuladas pela presença do antígeno. No caso das células T de memória central, a diferenciação em células T efetoras é mais lenta, traduzindo-se numa produção mais tardia de citocinas após a estimulação pela presença do antígeno (Storni T. *et al.*, 2005; Murphy, 2012; Kersten e Crommelin, 1995).

1.2. Vacinas baseadas em subunidades de patógenos

Tradicionalmente, o desenvolvimento de vacinas baseava-se na utilização de organismos patogênicos atenuados. O objetivo do uso deste tipo de agente é obter uma resposta imunitária sem o desenvolvimento da doença associada. No entanto, mesmo conseguindo obter uma resposta imunitária duradoura, surgem limitações relativas à segurança no uso deste tipo de sistemas, em indivíduos susceptíveis. Deste modo, as vacinas baseadas em subunidades, apenas contêm os componentes necessários para induzir a resposta adequada, os quais podem ser proteínas, péptidos ou carboidratos traduzindo-se numa melhor aceitação. Este tipo de componentes além de poderem ser administrados com maior segurança, permitem o desenvolvimento de estratégias imunostimulatórias onde as vacinas tradicionais são insuficientes (Moyle e Toth, 2013). No entanto, este tipo de vacinas apresenta uma imunogenicidade mais limitada, pelo que é necessário a adição de adjuvantes para produzir uma resposta imunitária duradoura (Reed *et al.*, 2008).

Os adjuvantes podem ser moléculas, compostos ou complexos macromoleculares que potenciam e aumentam a longevidade da resposta imunitária específica contra um antígeno específico (Wack e Rappuoli, 2005). Os adjuvantes podem ser classificados como imunostimulantes ou sistemas portadores. Um imunostimulante potencia a resposta imunitária a um determinado antígeno atuando diretamente nas células do sistema imunitário. Nesta classe de adjuvante incluem-se citocinas, exotoxinas bacteriais e saponinas que estimulam o sistema imunitário. Os adjuvantes portadores otimizam a apresentação dos antígenos ao sistema imunitário através da sua libertação controlada para aumentarem a resposta específica a um antígeno. Neste tipo de adjuvante incluem-se sais minerais, emulsões, lipossomas, virossomas, complexos imunostimulantes (ISCOM), entre outros. Uma vantagem de usar portadores em relação ao uso de imunostimulantes é a função protetora que desempenham, protegendo o antígeno das condições adversas encontradas na matriz extracelular, tais como a degradação por ação enzimática, ou interações não específicas com outras moléculas, para além de providenciar um perfil de libertação do antígeno prolongada. (Reed *et al.*, 2009). O uso de portadores é também vantajoso

para promover a passagem de antígenos por barreiras biológicas, como é o caso das mucosas intestinal e nasal (Correia-Pinto *et al.*, 2013).

Um tipo de adjuvante usado comumente em vacinas é baseado em sais de alumínio. Mesmo sendo muito usado, o seu mecanismo de atuação não é ainda claro. Vários mecanismos foram propostos para descrever a sua atuação. Os efeitos observados, propõem diferentes modos de atuação, entre eles a formação de depósitos no local de injeção, libertando continuamente o antígeno, mantendo a sua concentração local elevada, durante o tempo suficiente para permitir a captação e ativação das APCs (HogenEsch, 2002). Esta visão tem sido constantemente questionada, mais recentemente, as suas propriedades adjuvantes foram atribuídas à sua habilidade de promover um ambiente pro-inflamatório, que leva à ativação do sistema imunitário (Marrack *et al.*, 2008). Além de ser largamente utilizado, este tipo de adjuvante apresenta várias limitações, desde não conseguir induzir respostas imunitárias celulares, assim como alguma inconsistência a produzir imunidade humoral e a sua degradação no armazenamento (congelamento-secagem) (Peek *et al.* 2008).

Outro tipo de adjuvante é baseado em emulsões óleo em água (o/a). Emulsões são dispersões de duas fases líquidas imiscíveis que, devido à sua instabilidade são estabilizadas por surfactantes que diminuem a tensão superficial, prevenindo a aglutinação da dispersão. Este tipo de adjuvante começou com o *Freund's Complete Adjuvante* (FCA), que correspondia a uma emulsão de óleo mineral, parafina e micobactéria morta. Mais recentemente, outros adjuvantes baseados em emulsões de óleo em água tem sido estudados, entre eles encontra-se o MF59 aprovado para o uso em humanos, demonstrando uma grande capacidade de induzir resposta imunitária humoral e mediada por células, sendo mais eficiente que os sais de alumínio. Este adjuvante cria localmente um ambiente pro-inflamatório, induzindo a produção quimiocinas que aumentam o recrutamento de células imunitárias para o local de injeção, aumentando a captação de antígeno por células dendríticas e provocando a ativação de células T (O'Hagan e Podda, 2008).

Outro tipo de sistemas em estudo com um efeito adjuvante pronunciado são os ISCOM (*immunostimulating complex*) e ISCOMATRIX (*immunostimulating complex matrix*). Estes sistemas são produzidos pela combinação de colesterol, fosfolípido e adjuvante saponina Quil A. O caso do ISCOM, é incorporado na sua estrutura um

antigénio proteico ao contrário do que acontece com o ISCOMATRIX, que na sua produção não se inclui o antigénio, sendo adicionado posteriormente. Estes sistemas apresentam uma estrutura esférica tipo gaiola com dimensões de aproximadamente 40nm de diâmetro (Peek et al. 2008). O ISCOM e ISCOMATRIX são muito eficientes a induzir respostas imunológicas humorais e mediadas por células. Vários estudos mostram que a ação adjuvante deste tipo de sistemas estimula a libertação de citocinas, consistente com a ação das células Th1/Th17 e Th2. Adicionalmente, devido à sua estrutura, tornam-se alvos da ação de células do sistema imunitário como é o caso das APCs (Pearse e Drane, 2005).

Os lipossomas correspondem a agregados moleculares organizados em bicamadas lipídicas. Este tipo de sistema pode ser usado como portador de antigénios, facilitando a entrega do antigénio às APCs, mediando a apresentação cruzada de antigénios e promovendo uma resposta imunitária celular (Pinto *et al.*, 2013). Foram feitos estudos em humanos para diversas vacinas baseadas em lipossomas, incluindo vacinas contra malária, VIH, hepatite A, influenza, entre outras, que mostram ser seguras e altamente imunogénicas (Peek *et al.*, 2008). Adicionalmente, devido à natureza dos constituintes lipídicos usados, este tipo de sistemas é biodegradável. Existem vários métodos disponíveis e tipos de lípidos que podem ser utilizados na preparação de sistemas lipossomais que permitem um grande controlo das suas propriedades físico-químicas (Watson *et al.*, 2012).

1.2.1. Propriedades adjuvantes dos lipossomas

O efeito adjuvante dos lipossomas passa pela criação de um depósito no local de injeção, que prolonga a libertação e interação de antígenos livres ou associados a lipossomas com APCs promovendo a sua captação, processamento e migração do antígeno fagocitado para os módulos linfáticos para apresentação a linfócitos (Figura 2). É esperada a acumulação de APCs junto ao local de injeção devido à inflamação. A migração do antígeno para o sistema linfático também se pode dar pela drenagem de lipossomas intactos, sendo permitido a apresentação do antígeno intacto aos linfócitos B (Frézard, 1999; Watson *et al.*, 2012). A localização do antígeno no tecido linfático tem uma importância crítica para a obtenção de resposta imunitária, já que é nesse tipo de tecido onde se encontram os linfócitos, sendo que o antígeno que se localiza fora do tecido linfático não é facilmente apresentado. Desta forma, é importante a capacidade de um adjuvante promover a captação de APCs no local de injeção e o seu transporte para os nódulos linfáticos (Schijns, 2000).

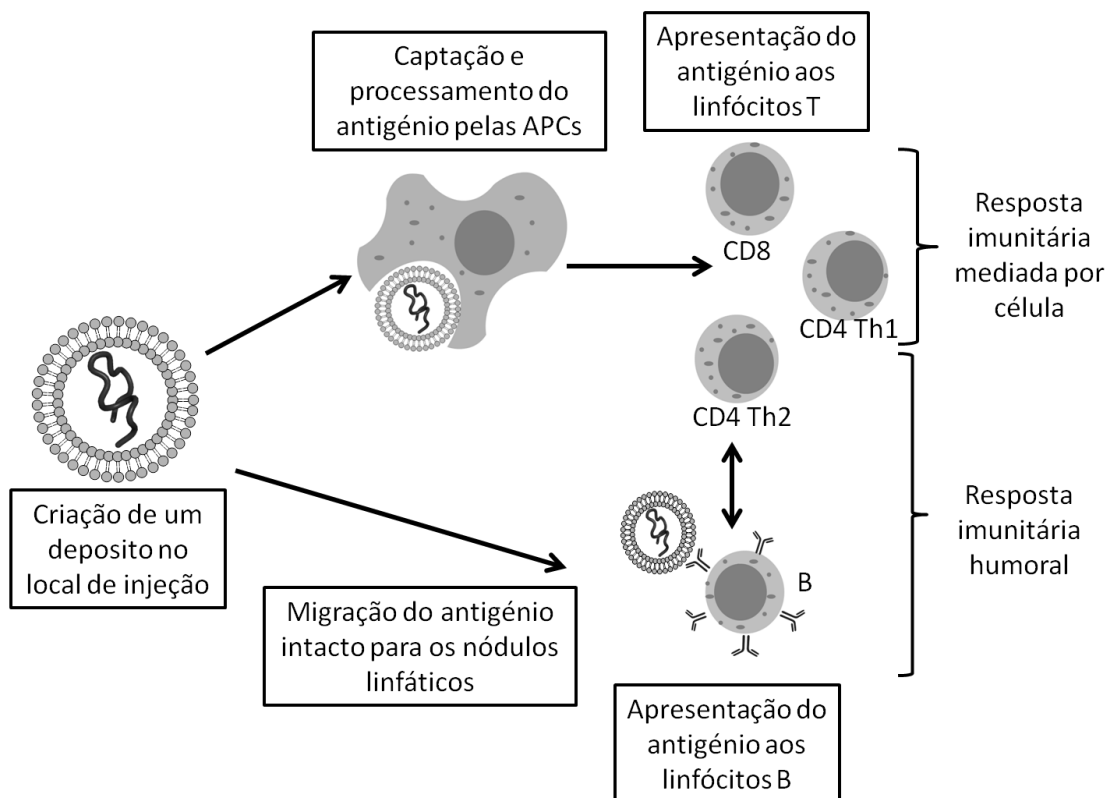


Figura 2 – Mecanismos de ação de lipossomas como adjuvantes

Vários fatores influenciam o efeito adjuvante dos lipossomas, que afeta o tipo de resposta imunitária obtida, como por exemplo a carga dos lipossomas. De uma forma geral verifica-se uma resposta imunitária mais potente quando se usam lipossomas catiónicos, ou aniônicos, comparativamente à resposta obtida usando lipossomas neutros (Nakanishi *et al.*, 1997). Outros estudos indicam a influência da carga dos lipossomas na resposta imunitária obtida. As vias Th1/Th17 e Th2 são afetadas de forma diferente dependendo da carga dos lipossomas (Badiie *et al.*, 2009b). Verifica-se maior retenção no local de injeção quando se usam lipossomas catiónicos (Henriksen-Lacey *et al.*, 2010). O tamanho dos lipossomas é outro fator a ter em conta na ação deste tipo de sistemas. Vários estudos demonstram a influência da dimensão dos lipossomas na indução de resposta imunitária (Brewer *et al.* 1998; Mann *et al.*, 2009). A fluidez da membrana é outro fator que é conhecido por influenciar a resposta imunitária de sistemas com antígenos associados a lipossomas. Os mecanismos associados a este efeito não são completamente conhecidos, no entanto existem evidências que suportam dois mecanismos possíveis, a influência da fluidez na libertação do antígeno e o modo como afeta a interação com as APCs (Badiie *et al.*, 2009a).

1.3. Desenvolvimento de estratégias imunoprotetoras contra *Candida albicans* baseada em sistemas lipossomais

1.3.1. Mecanismos de ação patogénica da *Candida albicans*

A *Candida albicans* é um organismo oportunista, que se encontra comumente no trato oral, gastrointestinal e genito-urinário. Sendo normalmente comensal para o hospedeiro no entanto, algumas alterações no hospedeiro podem induzir a transição deste organismo para patogénico. *C. albicans* pode provocar dois tipos principais de infeção a mais comum, é a infeção superficial que se dá nas mucosas (como é o caso da candidíase oral, ou vaginal) e a infeção disseminada, que se trata de uma forma mais perigosa que pode mesmo levar à morte do hospedeiro e que se desenvolve frequentemente em ambiente hospitalar (Shepherd *et al.* 1985). As infeções fúngicas apresentam-se como uma das principais causas de morte e morbidez na em indivíduos com o sistema imunitário comprometido (tal como acontece em pacientes que receberam transplante de órgãos e recorrem a tratamentos imunossupressores ou doentes com infetados com SIDA, doenças autoimunes, ou doentes com neoplasmas) (Dan e Levitz, 2006).

Candida albicans apresenta vários fatores de virulência que são responsáveis pela ação patogénica deste organismo. Entre os diferentes fatores encontram-se o dimorfismo, a expressão de adesinas e invasinas na superfície celular, tigmotropismo, formação de biofilmes, variação fenotípica e secreção de enzimas. O dimorfismo é uma característica na qual as células de *C. albicans*, que podem apresentar tanto na forma unicelular, leveduriforme, como na forma em filamentosa, em hifa. A sua forma em hifa é considerada a mais invasiva do que a forma em levedura, no entanto esta última crê-se ser a que está envolvida na disseminação. A expressão de adesinas e invasinas está associada aos processos de adesão a superfícies e aos mecanismos de invasão. Como exemplo deste tipo de proteínas tem-se a Als3, que está associada aos dois processos, a adesina Hwp1, a invasina Ssa1, entre outras. A invasão celular pode-se dar

por dois mecanismos diferentes, endocitose induzida (mediada por Als3 e Ssa1) e penetração ativa, associada à forma de hifa. A capacidade de formação de biofilme confere uma maior resistência à eliminação por agentes antimicrobianos e fatores imunitários. A formação de biofilme inclui a adesão a um substrato (pode ser biótico ou abiótico), proliferação, formação de matriz extracelular (composta principalmente por β 1,3-glucan). A formação de biofilme também confere uma maior resistência à eliminação por neutrófilos, inibindo a produção de espécies reativas de oxigênio, sendo sugerido a relevância dos β -glucans na matriz extracelular, neste tipo de proteção (Mayer *et al.*, 2013).

1.3.2. Estratégias imunoprotetoras baseadas em subunidades

A elaboração de vacinas baseadas em subunidades, tem sido estudada para o desenvolvimento de estratégias imunoprotetoras contra a *Candida Albicans*.

Um estudo levado a cabo por Luo *et al.* (2010) centra-se na expressão de um fator de virulência que confere resistência à fagocitose, expressado pelo gene Hyr1. O uso de vacinação com um recombinante Hyr1 em ratos, resultou na proteção contra a candidíase disseminada, para além disso, o uso de anticorpos anti-Hyr1p demonstrou aumentar a eliminação por neutrófilos. Desta forma estabeleceu-se o Hyr1p como um alvo viável para o desenvolvimento de vacinas contra a candidíase disseminada.

Outra estratégia em estudo centra-se no uso de conjugados de laminarina-CRM197. A laminarina é um polissacarídeo constituído por β -glucan, que é produzido por diferentes espécies de fungos. Devido à sua pobre imunogenicidade, este polissacarídeo foi associado a um toxoide de difteria (CMR 197) usado como proteína portadora noutros tipos de vacinas. Este conjugado demonstrou induzir a produção de anticorpos anti- β -glucan. Estes anticorpos associam-se preferencialmente a hifas da *C. albicans* causando a inibição do seu crescimento (Torosantucci et al., 2005).

Numa revisão recente (Cassone e Casadevall, 2012) são referidos dois tipos de vacinas que se encontram na fase 1 de ensaios clínicos. Estas vacinas, tal como nos casos anteriores, são baseadas no uso de subunidades. Uma das abordagens utiliza um recombinante de Als3 com um adjuvante baseado em sais de alumínio, mostrando-se eficiente na proteção contra a candidíase mucosa e disseminada. Em ensaios com ratos mostrou a indução de resposta imunitária mediada por células Th1 e Th17. A segunda vacina usa uma formulação virossomal com um recombinante de Sap2, estimulando a proteção por anticorpos.

Xin *et al.* (2008, 2011) estudaram a imunização através da produção de anticorpos. Usando glicoproteínas sintéticas combinando β -mannan com epítomos peptídicos, mostraram a possibilidade de usar glicopéptios ou péptidos da parede celular como estratégia para estimular uma resposta imunitária mediada por anticorpos.

1.3.2.1. Uso de lipossomas para o desenvolvimento de estratégias imunoprotetoras baseadas em subunidades

Nos estudos feitos por (Pitarch *et al.*, 2004; Clancy *et al.*, 2008), que procuravam descobrir que proteínas se expressavam durante a patogénese da candidíase disseminada, verificou-se a expressão de diversas proteínas, entre as quais *fructose-bisphosphate aldolase* (Fba); *methyltetrahydropteroyltriglutamate* (Met6); *hyphal wall protein-1* (Hwp1); *enolase* (Enol); *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (Gap1) e *phosphoglycerate kinase* (Pgk1).

Mais tarde, Xin *et al.* (2008) num estudo de vacinas contra *C. albicans* baseadas em glicopéptidos sintéticos, selecionaram epítomos das proteínas referidas anteriormente. A sequência dos péptidos foi obtida recorrendo a um algoritmo de busca de epítomos (GenScript, Antigen Design Tool, OptimumAntigen). Todos os péptidos selecionados apresentam 100% de homologia com *Candida*, sem apresentarem nenhuma identidade com proteínas de mamíferos. Adicionalmente foi realizada uma análise com o programa *Propred1* (Sing e Raghava, 2003) que prevê vários locais de ligação dos péptidos com MHC de classe 1 e com o programa *Propred* (Singh e Raghava, 2001) que prevê a ligação dos péptidos Fba, Met6 e Pgk1 aos alelos HLA-DR dos MHC de classe 2.

No presente estudo pretende-se avaliar a interação de antígenos da *Candida* com uma membrana lipídica, para o desenvolvimento de estratégias imunoprotetoras. Foram escolhidos os péptidos Fba, Met6, Enol e Pgk1 (Tabela 1) como antígenos, e para atuar como adjuvante foi escolhida a Monooleína.

A monooleína é um lípido neutro, natural, não tóxico, biocompatível e biodegradável. Em excesso de água tende a formar fases cúbicas que são termodinamicamente estáveis. O uso de fases cúbicas tem especial interesse na cristalografia de proteínas e tem sido utilizado para a entrega de fármacos (Caffrey, 2003).

O uso de surfactantes que formam fases cúbicas, tem especial interesse como um veículo de entrega de fármacos, adequado para diferentes vias de administração. Para o caso da monooleína, verificou-se a criação de efeito de depósito na injeção intramuscular ou subcutânea, apresentando um perfil de liberação prolongado de fármacos. Adicionalmente também se verifica uma boa adesão a pele e a mucosas, o que torna um veículo viável para a entrega de fármacos pela via transdérmica e transmucosa (Drummond e Fong, 2000).

Mais recentemente foi estudada a mistura de lípidos que formam fases lamelares com lípidos que formam fases não-lamelares. Esta questão foi abordada por Oliveira *et al.* (2012) caracterizando sistemas mistos contendo DODAB e monooleína para diferentes razões na mistura dos dois lípidos, com vista ao uso destes complexos para a compactação de ADN e transfeção.

Tabela 1 – Sequência de aminoácidos dos péptidos propostos para estudo

Proteína	Sequência do péptido
enolase (Enol)	DSRGNPTVEVDFTT
phosphoglyceratekinase (Pgk1)	VPLDGKTITNNQRI
fructose-bisphosphatealdolase (Fba)	YGKDVKDLFDYAE
methylnetetrahydropteroyltriglutamate (Met6)	PRIGGQRELKKITE

1.4. Modelação Molecular

1.4.1. Campos de força empíricos

O estudo da estrutura e função de moléculas e sistemas biológicos pode ser feito por modelos moleculares baseados em mecânica clássica. Este tipo de funções tem formas simples, o que permite fazer um número elevado de cálculos em tempo reduzido e, conseqüentemente, estudar sistemas biológicos com algum grau de complexidade molecular.

O conjunto das funções de energia juntamente com o conjunto de parâmetros a elas associados é o que se denomina como campo de força empírico. Os parâmetros são ajustados de forma ao campo de força estar de acordo com os resultados obtidos por cálculos de mecânica quântica, efetuados em moléculas simples e de acordo com resultados experimentais para sistemas modelo. A forma funcional mais simples é conhecida como o modelo aditivo, ou campo de força de classe 1, de acordo com as classificações propostas por Hwang *et al.* (1994).

Genericamente, um campo de forças baseado em mecânica molecular inclui termos que descrevem as interações entre átomos ligados quimicamente, o ângulo formado entre três átomos e a torção de uma ligação, sendo para tal considerados quatro átomos. O termo restante é correspondente a interações não ligantes entre átomos, nomeadamente interações eletrostáticas e de Van der Waals (Equação 1).

$$\begin{aligned}
 U(r^N) = & \sum_{\text{ligação}} \frac{k_b}{2} (l_i - l_{i,0})^2 + \sum_{\text{ângulo}} \frac{k_\theta}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{diédro}} \frac{V_i}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma)) \\
 & + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i-1}^N \left(4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right)
 \end{aligned} \tag{Eq. 1}$$

O primeiro termo na equação 1 corresponde ao modelo da interação entre dois átomos ligados entre si, descrevendo-a como um potencial harmónico. O segundo termo, corresponde à modelação de ângulos de valência, usando também um potencial harmónico. Os ângulos de valência são formados por três átomos que estejam ligados. O terceiro termo descreve o potencial associado à torção do ângulo de uma ligação. O quarto termo corresponde à descrição das interações não ligantes, entre átomos de moléculas diferentes, ou da mesma molécula, mas distanciados de pelo menos três ligações. Estas interações incluem o potencial de Lennard-Jones, para a descrição das interações de van der Waals e o potencial de Coulomb, para a descrição das interações eletrostáticas.

1.4.1.1. Interações ligantes

1.4.1.1.1. Ligações

As ligações entre dois átomos podem ser descritas com recurso à lei de Hooke, que restringe harmonicamente o comprimento da ligação em relação a uma distância de referência (Equação 2).

$$U(l) = \frac{k_b}{2} (l - l_0)^2 \quad (\text{Eq. 2})$$

A equação 2 trata-se de uma expressão simples, dependendo apenas dos parâmetros k_b , correspondente à constante de elasticidade da ligação e l_0 , referente à distância de referência. O perfil de energia obtido usando este tipo de descrição está representado na Figura 3, onde se verifica um perfil simétrico em relação à distância de referência, correspondente ao mínimo observado.

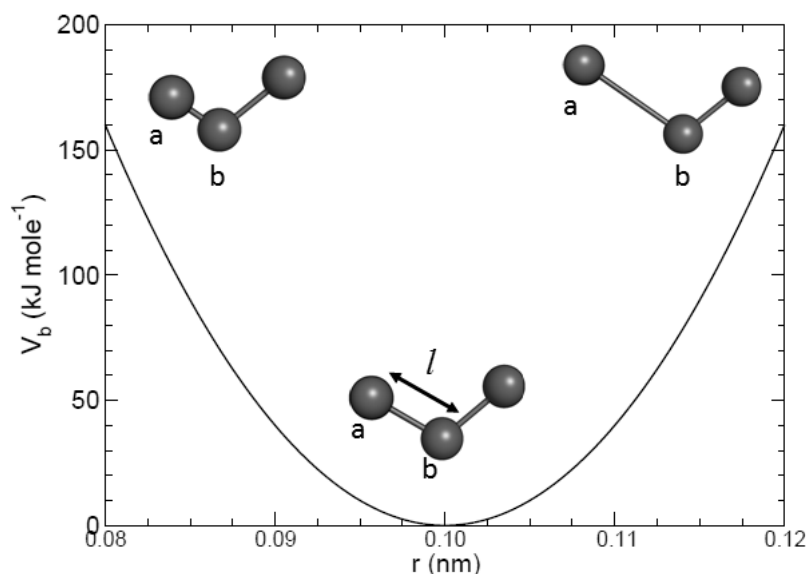


Figura 3 - Potencial de ligação entre dois átomos (a e b) usando uma restrição harmônica (Adaptado de Berk Hess, David van der Spoel, Erik Lindahl et al. 2010)

Outra forma útil para descrever o potencial de uma ligação entre dois átomos é conhecido como o potencial de Morse (Morse, 1929). Este potencial apresenta um poço assimétrico e um valor nulo para uma distância infinita, o que permite uma descrição mais correta do perfil de energia entre dois átomos (Equação 3).

$$U(l) = D_e [1 - \exp(-a(l - l_0))]^2 \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde D_e corresponde à altura do poço de potencial, o parâmetro $a = \omega \sqrt{\mu / 2D_e}$, com ω correspondente a frequência de vibração da ligação e μ correspondente à massa reduzida, l e l_0 dizem respeito ao comprimento da ligação e distância de referência, respetivamente.

A forma funcional baseada na lei de Hooke é uma aproximação válida para descrever oscilações junto do comprimento de ligação de equilíbrio. Podem ser escritas formas funcionais de ordem superior para descrever a zona de potencial junto da posição de equilíbrio (função de potencial cúbica) sendo uma aproximação mais precisa ao potencial de Morse.

1.4.1.1.2. Ângulo de ligação

A descrição do ângulo formado por três átomos a, b e c, estando os átomos a e c ligados a b, pode ser descrita por uma por um potencial baseado na lei de Hooke (Equação 4).

$$U(\theta) = \frac{k_\theta}{2} (\theta - \theta_0)^2 \quad (\text{Eq. 4})$$

A forma funcional depende de dois parâmetros, uma constante elástica k_θ e ângulo de referência θ_0 . Também podem ser escritas formas funcionais de ordem superior. O perfil de energia obtido usando este tipo de restrição está representado na Figura 4.

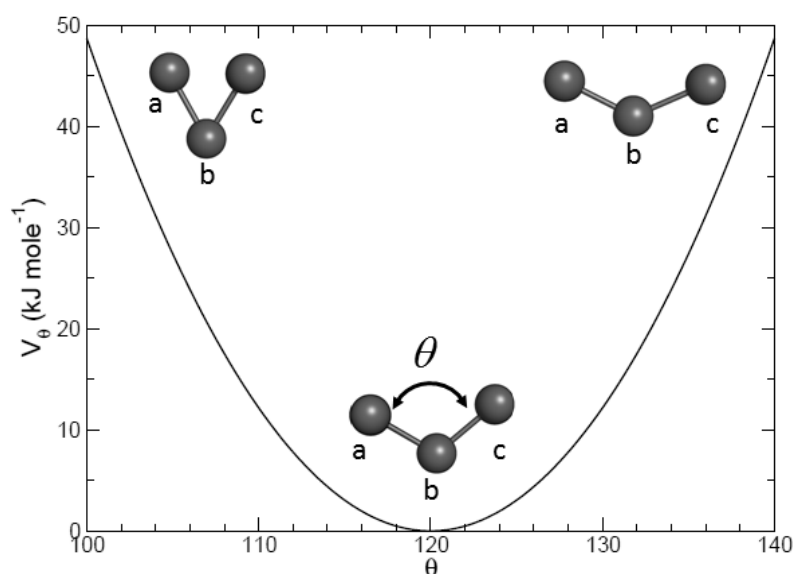


Figura 4 - Potencial do ângulo de ligação entre três átomos (a, b e c) usando uma restrição harmônica (Adaptado de Berk Hess, David van der Spoel, Erik Lindahl et al. 2010)

1.4.1.1.3. Diedros

Um diedro é um ângulo formado entre dois planos, este tipo de ângulo é útil para descrever a rotação de uma ligação entre átomos, sendo para tal considerados quatro átomos ligados consecutivamente ao longo de três ligações. Tome-se como exemplo quatro átomos, a, b, c e d, ligados consecutivamente. O diedro é definido pelos planos formados pelos átomos a, b, c e os átomos b, c, d (Figura 5).

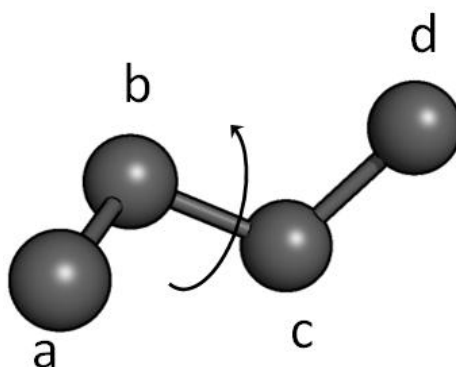


Figura 5 - Representação de um diedro

Ao contrário do que acontece com a variação do comprimento da ligação entre dois átomos e do ângulo formado por três átomos ligados, que são interações rígidas sendo necessário fornecer uma grande quantidade de energia para haver uma deformação significativa, a rotação de uma ligação tem uma grande flexibilidade e tem uma grande influência na descrição das propriedades estruturais de uma molécula.

$$U(\omega) = \sum_{n=0}^N \frac{v_n}{2} [1 + \cos(n\omega - \gamma)] \quad (\text{Eq. 5})$$

A equação 5 é função do diedro ω e permite descrever o perfil de energia associado à rotação de uma ligação. O parâmetro v_n a amplitude máxima da função, no entanto, esta amplitude por si só não descreve na totalidade a barreira de energia existente, havendo também a contribuição de interações não ligantes entre os átomos a e b, também conhecidas como interações 1-4. O parâmetro n corresponde ao

parâmetro de multiplicidade, que determina o número de mínimos existentes na função. O parâmetro γ corresponde ao fator de fase, que determina a posição do mínimo de energia da função.

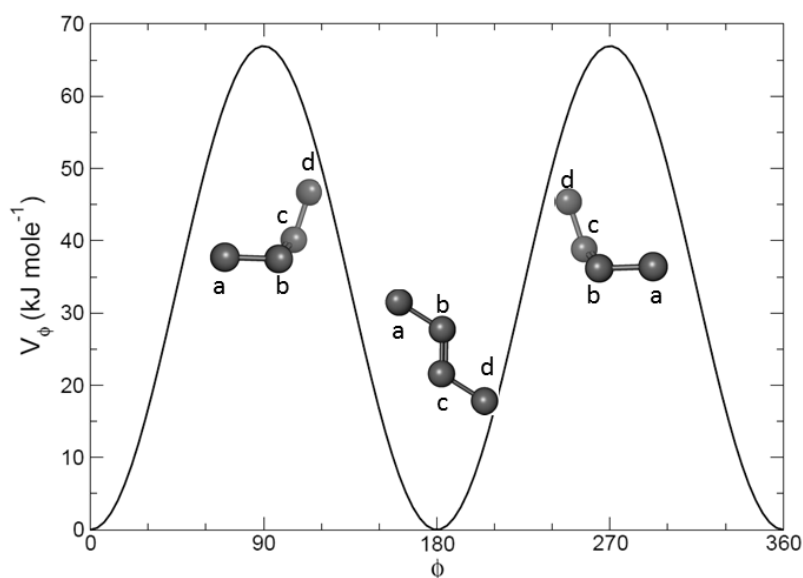


Figura 6 - Perfil do potencial do diedro para uma ligação dupla entre os átomos b e c (Adaptado de Berk Hess, David van der Spoel, Erik Lindahl et al. 2010).

Para alguns casos torna-se útil definir um termo adicional conhecido como diedro impróprio, que é particularmente útil para garantir a planaridade em átomos que rodeiam um átomo central com hibridização sp^2 , como por exemplo um anel aromático, restringindo harmonicamente as posições dos átomos ao plano formado entre eles (Figura 7).

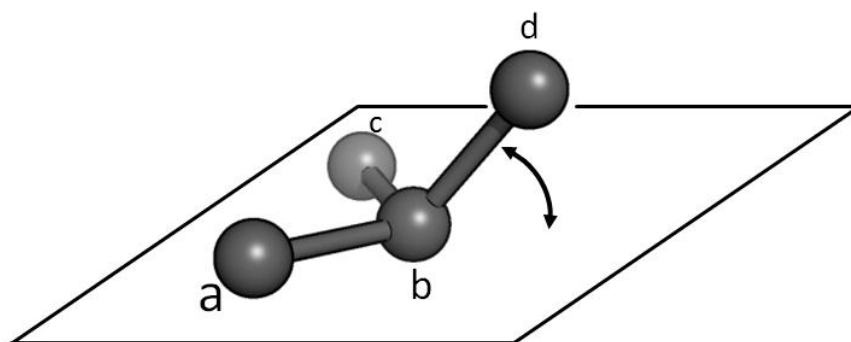


Figura 7 - Exemplo de uma vibração fora do plano formado pelos átomos a b e c

1.4.1.2. Interações não ligantes

1.4.1.2.1. Interações eletrostáticas

Tipicamente, num campo de forças, as interações eletrostáticas são descritas com recurso ao uso de cargas parciais usando como estratégia o fracionamento da carga de uma molécula em diversas cargas pontuais ao longo da mesma. Desta forma o potencial eletrostático pode ser descrito recorrendo à lei de Coulomb (Equação 6).

$$U = \sum_{i=1}^{N_A} \sum_{j=1}^{N_B} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (\text{Eq. 6})$$

O potencial eletrostático é uma propriedade contínua, que não é facilmente representada analiticamente. De forma a atribuir cargas parciais que reproduzam a função potencial, Cox e Williams (1981) propuseram um método ajusta o potencial eletrostático obtido por métodos quânticos, ao campo obtido pelas cargas pontuais. Outras estratégias seguiram a ideia de Cox e Williams, nomeadamente RESP (*Restrained Eletrostatic Potential*) proposta por Bayly *et al.* (1993). Os métodos baseados em ESP (*Eletrostatic Potential*) ajustam o potencial eletrostático, calculado por métodos quânticos em várias superfícies moleculares variando o raio de van der Waals, a um modelo de cargas pontuais. Este método apresenta a limitação de não conseguir determinar cargas em átomos interiores, sendo necessário o uso de restrições durante o ajuste, o método conhecido como RESP.

1.4.1.2.2. Interações de van der Waals

As forças de van der Waals podem ser consideradas como uma soma de várias contribuições de forças repulsivas e atrativas. A contribuição atrativa é derivada das forças de London, que surgem da criação de dipolos instantâneos devido a distorções na distribuição eletrônica, podendo induzir esse dipolo num átomo vizinho surgindo assim um efeito atrativo.

As contribuições repulsivas podem ser justificadas pelo princípio de exclusão de Pauli que proíbe dois elétrons com a mesma multiplicidade de spin de ocuparem a mesma posição no espaço, criando uma força repulsiva a curtas distâncias.

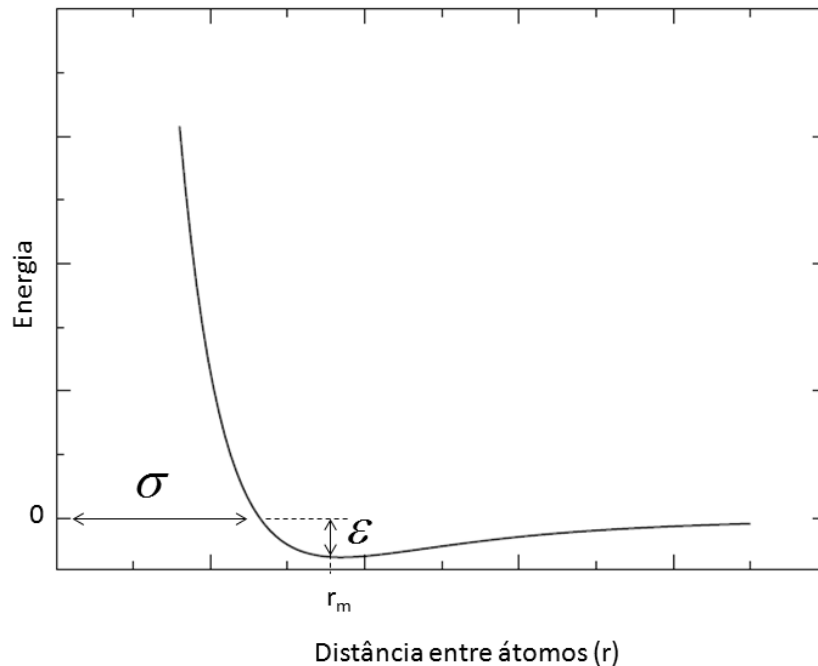


Figura 8 - Potencial de Lennard-Jones (Adaptado de Berk Hess, David van der Spoel, Erik Lindahl et al. 2010).

O potencial de Lennard Jones é uma função que permite descrever a curva de potencial devido às forças de van der Waals (Figura 8). A interação entre dois átomos pode ser descrita pela equação 7.

$$U(r) = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (\text{Eq. 7})$$

O parâmetro σ corresponde à distância para a qual a energia é zero, também conhecida como o diâmetro de colisão e ϵ corresponde á altura do poço de potencial (ver figura 6). Outros parâmetros podem ser escolhidos em vez de, como por exemplo a distância correspondente ao mínimo de potencial r_m . Independentemente dos parâmetros utilizados, o que caracteriza a curva de potencial de Lennard-Jones é a variação das forças repulsivas com r^{-12} e as forças atrativas com r^{-6} .

1.4.1.3. Solvatação

O tratamento do ambiente aquoso em simulações biomoleculares pode ser feito recorrendo a modelos explícitos de água ou modelos de solvente contínuos. Dois modelos explícitos de água bastante populares, são o TIP3P (Jorgensen *et al.* 1983) e o SPC (Berendsen *et al.* 1981). Ambos os modelos usam três pontos rígidos para a interação eletrostática, duas cargas parciais positivas nos dois átomos de hidrogénio e uma negativa no átomo de oxigénio. As interações de van der Waals usam a função de Lennard-Jones com um ponto de interação localizado no átomo de oxigénio. A parametrização e a geometria destes dois modelos diferem ligeiramente. A escolha do modelo de água explícito deve ter em conta o campo de força que é utilizado. Campos de força como o CHARMM e o AMBER, usaram o modelo explícito de água TIP3P no seu desenvolvimento, já campos de força como GROMOS, foram desenvolvidos usando o modelo SPC, entre outros modelos utilizados (Mackerell 2004). No uso de modelos de solvente contínuo permitem uma grande economia em termos computacionais, no entanto falham na descrição de algumas interações solvente biomolécula importantes.

1.4.2. Minimização de energia

Em mecânica molecular, a minimização de energia procura encontrar a conformação correspondente ao mínimo de energia local mais próximo relativamente à conformação de partida na superfície de energia potencial. A estratégia para encontrar os mínimos da superfície de energia potencial, consiste em fazer variar a posição dos átomos até encontrar o mínimo de energia.

Um método muito usado em mecânica molecular é o método *steepest descent*. Trata-se de um método derivativo de primeira ordem que se move em favor do gradiente negativo da superfície de energia potencial. Esta direção é definida por um vetor unitário s_k , para 3N coordenadas cartesianas, sendo N o número de partículas no sistema (Equação 8).

$$s_k = -\frac{g_k}{|g_k|} \quad (\text{Eq. 8})$$

Um algoritmo usado para fazer a aproximação ao mínimo recorre à atribuição de um passo inicial h_n , para definir as novas posições. A partir de uma posição inicial r_k , com o vetor s_k e o passo h_n calcula-se, numa primeira iteração, as novas posições r_{k+1} (Equação 9).

$$r_{k+1} = r_k + s_k h_n \quad (\text{Eq. 9})$$

O potencial é avaliado para r_{k+1} , se o novo potencial é menor que em r_k , então a nova posição é aceite e o valor de h_n é incrementado num fator arbitrado (p.e. 1.2). No caso do potencial em r_{k+1} ser superior ao potencial r_k , os novos pontos são rejeitados e o passo h_n é diminuído por um fator arbitrado (p.e 0.2). Este processo

procura iterativamente os mínimos, até o gradiente de potencial atingir um valor especificado, ou número de iterações definido.

Este método é um método robusto, que permite encontrar mínimos mesmo que o ponto inicial esteja muito afastado. No entanto não será o método mais eficiente, já que este não apresenta o caminho mais direto, para o mínimo. Dependendo do tipo de perfil da superfície de potencial, a aproximação pode ser mais rápida, ou, no caso de existência de vales estreitos, o caminho para o mínimo pode oscilar muito, o que leva a uma série de passos adicionais até atingir o mínimo.

1.4.3. Condições fronteira periódicas

As dimensões reduzidas dos sistemas moleculares impedem que se incluam fronteiras rígidas que confinem o sistema molecular. No entanto, é necessário a criação de condições fronteira que permitam a simulação de sistemas condensados. Uma solução para este problema é a implementação de uma estratégia de condições periódicas de fronteira. Nestas condições, o sistema é representado dentro de uma célula, que pode ter várias geometrias. A escolha da geometria é feita mediante o tipo de sistema que se pretende estudar. As geometrias devem ter formas que não deixem espaços entre as várias réplicas do sistema. Para um sistema tridimensional existem várias geometrias que são válidas: cúbica, prisma hexagonal, octaedro truncado, dodecaedro rômbo, dodecaedro alongado (Adams ,1983) (Figura 9).

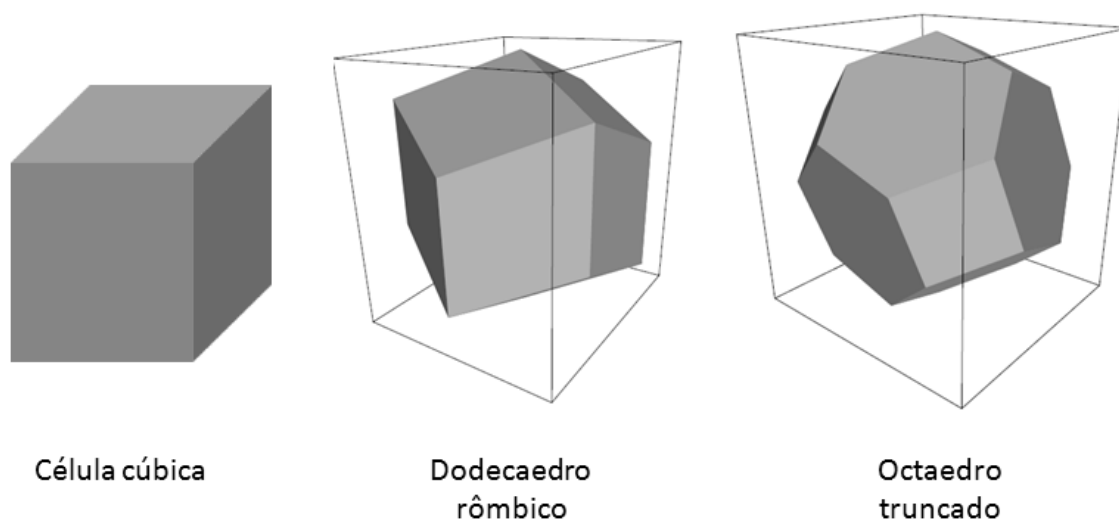


Figura 9 - Exemplo de algumas geometrias possíveis para a célula unitária (Adaptado de Berk Hess, David van der Spoel, Erik Lindahl et al. 2010).

1.4.3.1. Tratamento de interações não ligantes

Num sistema com muitas partículas, o número de interações não ligantes a ser avaliada torna-se muito dispendioso computacionalmente à medida que o sistema cresce em número de partículas. A estratégia utilizada para limitar o número de interações a ser analisadas é usar um raio de *cut-off* para interações não ligantes, distância a partir da qual se deixa de considerar as interações não ligantes entre pares de átomos. Outra condição que é necessário ter em conta, relaciona a distância de *cut-off* com a dimensão da caixa, *minimum image convention* (Figura 10). Esta relação procura garantir que um átomo presente num sistema, não interaja com a sua imagem, assim sendo, considera-se que distância de *cut-off* deve ser inferior a metade do comprimento da menor dimensão da célula. O potencial de Lennard-Jones decai rapidamente com o aumento da distância entre átomos, sendo a sua contribuição pouco significativa a uma distância superior a 2.5σ . Desta forma, pode-se convencionar, para interações descritas pelo potencial de Lennard-Jones, um raio de *cut-off* equivalente a 2.5σ , a partir do qual o potencial é nulo.

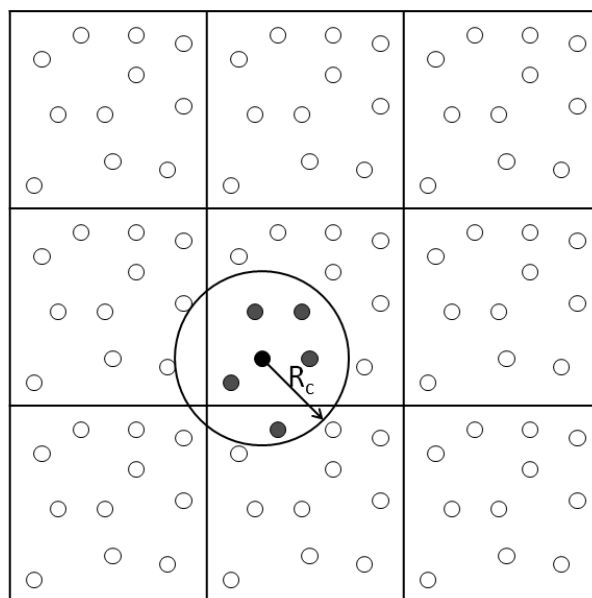


Figura 10 - Uso de *cut-off* e *minimum image convention*. As interações não ligantes só são consideradas para partículas até uma distância R_c .

1.4.3.2. Particle Mesh Ewald

O uso de uma distância de *cut-off*, como estratégia para melhorar a performance na simulação, provoca uma descontinuidade junto ao limite de *cut-off*, o que introduz uma imprecisão na descrição das interações nessa zona. Esta situação é bastante agravada em interações de longo alcance, como é o caso das interações eletrostáticas entre cargas, que decaem lentamente com a distância ($1/r$).

Uma proposta para o tratamento de interações eletrostáticas de longo alcance foi proposta por Ewald (1921) (citado por Toukmaji e Board, 1995), em que são consideradas todas as interações entre cargas dentro do sistema e as interações das cargas e as suas imagens. A interação entre cargas é descrita de acordo com a lei de Coulomb. São consideradas as interações entre as cargas pontuais q_i e q_j dentro da célula unitária $|n| = 0$, rejeitando neste caso as interações para $i=j$, e as interações com as imagens presentes nas réplicas a uma distância $|r_{ij} + n|$ (Equação 10).

$$U = \frac{1}{2} \sum_{|n|=0} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 |r_{ij} + n|} \quad (\text{Eq. 10})$$

No entanto este tipo de adição equação converge lentamente, para tal Ewald propôs uma forma que substitui esta adição por um conjunto de séries que convergem rapidamente. Uma série no espaço real e outra no espaço recíproco (Equação 11).

$$\frac{1}{r} = \frac{f(r)}{r} + \frac{1-f(r)}{r} \quad (\text{Eq. 11})$$

O método usado na adição de Ewald é baseado na ideia de que cada carga do sistema está rodeada por uma distribuição Gaussiana de carga de sinal oposto que a neutralize. Esta distribuição funciona como uma blindagem, que limita o número de interações com cargas vizinhas para um curto alcance. Para contrabalançar a distribuição Gaussiana é usada uma segunda distribuição Gaussiana, com o mesmo

sinal e amplitude para todas as cargas, mas determinada no espaço recíproco usando transformadas de Fourier (Figura 11).

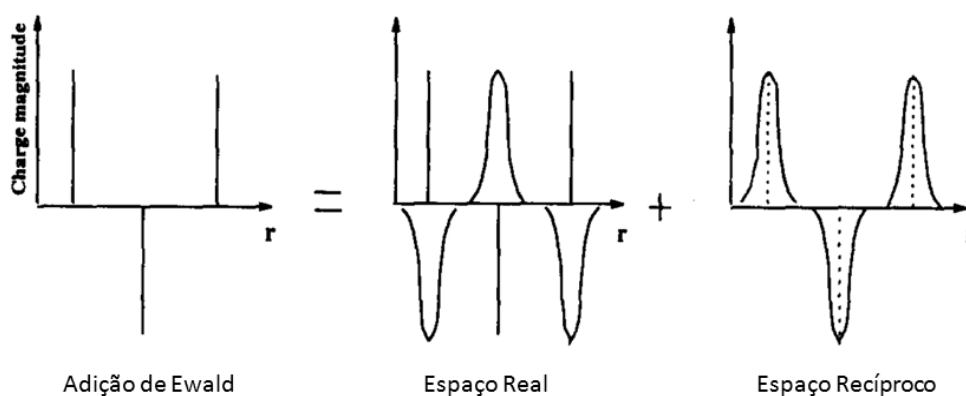


Figura 11 - Componentes da adição de Ewald para a uma dimensão para cargas pontuais. Na figura estão representadas as cargas pontuais, por linhas verticais e as distribuições Gaussianas (Adaptado de Toukmaji A. Y., Board J. A. Jr 1996)

Mesmo sendo uma técnica que se considera como sendo correta para a incluir os efeitos das forças de longo alcance, apresenta algumas limitações. O facto de se estarem a usar condições fronteira periódicas resulta na minimização artificial das interações entre cargas para cargas separadas a uma distância maior do que metade da menor dimensão da célula, qualquer flutuação instantânea na célula, vai ser replicada em todas as cópias do sistema.

A adição de Ewald é uma técnica muito dispendiosa em termos computacionais. Uma estratégia usada para melhorar a performance, baseia-se na interpolação da distribuição das cargas pontuais num espaço de coordenadas contínuo, para uma distribuição num espaço discreto, sendo definida nos centros geométricos de uma grelha (Figura 12).

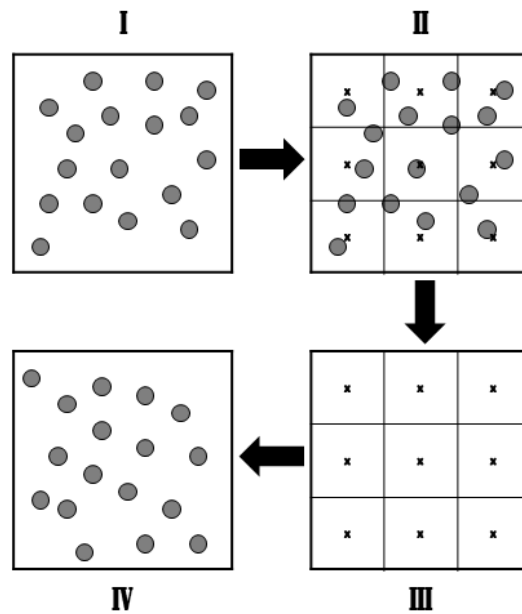


Figura 12 - Representação do métodos *particle-mesh*. (I) Sistema com partículas carregadas. (II) Interpolação das cargas para uma grelha. (III) O potencial e forças são calculados para os centros geométricos da grelha. (IV) O potencial e as forças são usadas para calcula as novas posição das partículas (Adaptado de Toukmaji A. Y., Board J. A. Jr 1996)

O método *particle mesh Ewald* (PME), inspirado no método *particle-particle particle-mesh* (PPM) (Hockney e Eastwood 1988), baseia-se na adição de Ewald, usando uma série no espaço real e outra no espaço recíproco recorrendo a uma distribuição de cargas Gaussiana. A série no espaço real é calculada explicitamente, atribuindo-lhe uma distância de *cut-off* e a série no espaço recíproco usa a interpolação de cargas em pontos distribuídos numa grelha para o cálculo do potencial (Darden *et al.* 1993).

1.4.4. Dinâmica Molecular

1.4.4.1. Leapfrog

De forma a gerar Dinâmica Molecular a partir de modelos de potencial contínuos, como é o caso dos campos de forças, são usados métodos de integração de diferenças finitas.

O método *leapfrog* é um método de integração de equações diferenciais usando diferenças finitas. Neste método as posições e velocidades são atualizadas com uma diferença de fase de $\Delta t/2$ (Figura 13).

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \Delta t \, v\left(t + \frac{1}{2} \Delta t\right) \quad (\text{Eq. 12})$$

$$v\left(t + \frac{1}{2} \Delta t\right) = v\left(t - \frac{1}{2} \Delta t\right) + \Delta t \, a(t) \quad (\text{Eq. 13})$$

A atualização da posição $r(t)$ usando um passo de tempo Δt utiliza a velocidade calculada para o tempo $t + \Delta t/2$ para determinar as novas posições no instante de tempo $t + \Delta t$ (equação 12). Por sua vez a velocidade é atualizada usando uma velocidade anterior a t , no instante $t - \Delta t/2$, usando um passo de tempo Δt . As novas velocidades são calculadas usando os valores de aceleração devido às forças que atuam no sistema determinadas pelas posições no instante t (Eq. 13).

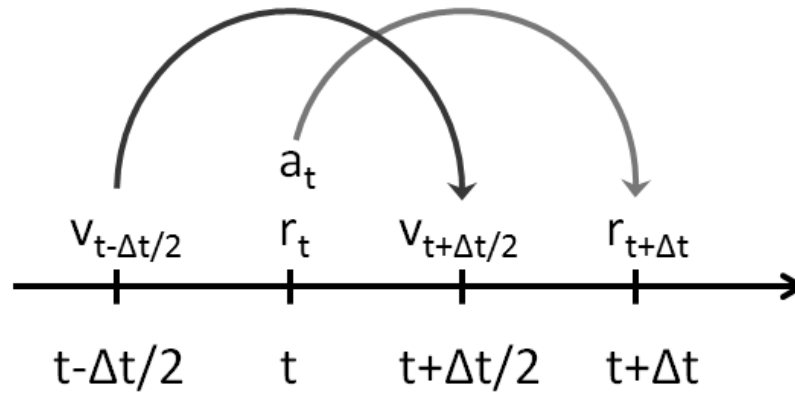


Figura 13: Representação do método de integração *leapfrog*, as posições e velocidades são calculadas com uma diferença de fase de $\Delta t/2$

Em dinâmica molecular, o passo de tempo escolhido é limitado pelos movimentos de maior frequência, como é o caso das vibrações das ligações, que apresentam uma frequência alta. De forma a poder usar passos de tempo maiores aplicam-se contrações que permitem uma representação adequada do comportamento físico de movimentos vibracionais rápidos. Um dos algoritmos de contração usado em dinâmica molecular é o LINCS (*Linear Constraint Solver for Molecular Simulations*) (Hess *et al.*, 1997) que corrige o comprimento das ligações, após uma atualização do sistema sem aplicação de contrações.

1.4.4.2. Controlo de temperatura e pressão

Uma estratégia para garantir que o sistema está a uma temperatura desejada proposta por Berendsen *et al.* (1984), consiste em acoplar o sistema que está a ser simulado a um banho térmico externo. Este banho tem uma temperatura fixa e tenta corrigir as flutuações de temperatura que existam no sistema. A correção da temperatura é feita com ajustes á energia cinética usando a seguinte relação:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{(T_{\text{banho}} - T)}{\tau} \quad (\text{Eq. 14})$$

Segundo esta relação (Equação 14), a correção da temperatura é feita para que a taxa de variação da temperatura (dT) do sistema, para um intervalo de tempo dt , seja proporcional à diferença de temperatura entre o banho (T_{banho}) e o sistema (T). A força do acoplamento do banho ao sistema é ajustada pelo parâmetro de acoplamento τ .

Uma limitação deste método é fato de suprimir as variações da energia cinética, no caso de haver um soluto numa solução acoplada a um banho térmico, vai promover artificialmente uma diferença de temperatura entre o soluto e o solvente. O fato da temperatura global do sistema se manter á temperatura desejada, não garante que diferentes componentes do sistema estejam à mesma temperatura. Uma estratégia para ultrapassar essa limitação consiste em criar diferentes grupos para diferentes componentes do sistema e acopla-los individualmente ao banho térmico.

Uma estratégia para o controlo de pressão sugerida por Berendsen *et al.* (1984), análoga ao controlo de temperatura, sugerido pelo mesmo autor, baseia-se no acoplamento do sistema a um banho externo com pressão constante. A correção é feita segundo a relação:

$$\frac{dP(t)}{dt} = \frac{(P_{\text{banho}} - P(t))}{\tau_p} \quad (\text{Eq. 15})$$

Segundo esta relação (Equação 15), a correção da pressão é feita para que a taxa de variação da pressão (dP) do sistema, para um intervalo de tempo dt , seja proporcional à diferença de pressão entre o banho (P_{banho}) e o sistema (P). Este ajuste é feito tendo em conta uma constante de acoplamento τ_p . A correção da pressão é feita através do dimensionamento das coordenadas e dimensões da caixa. Este dimensionamento pode ser anisotrópico, sendo o ajuste feito independentemente para todas as dimensões, isotrópico, sendo aplicado o mesmo ajuste a todas as dimensões, ou semi isotrópico, sendo duas dimensões (x e y) ajustadas isotropicamente, sendo a outra dimensão (z) ajustada independentemente.

1.4.5. Potencial de Força Média

O conceito de PMF (Potencial de Força Média) foi introduzido por Kirkwood (1935), trata-se de um método que pode ser utilizado para se obter o perfil de energia livre ao longo de uma determinada coordenada que separa dois estados de energia diferentes. O PMF ($W(\xi)$) ao longo de uma determinada coordenada (ξ) é definida a partir da função de distribuição média $\langle \rho(\xi) \rangle$ pela relação estabelecida na equação 16, com $W(\xi^*)$ e $\langle \rho(\xi^*) \rangle$ sendo constantes.

$$W(\xi) = W(\xi^*) - k_B T \ln \left[\frac{\langle \rho(\xi) \rangle}{\langle \rho(\xi^*) \rangle} \right] \quad (\text{Eq. 16})$$

A obtenção do potencial de força média ao longo de uma coordenada de reação através de uma simulação de Dinâmica Molecular pode não ser a correta devido a uma má amostragem. A existência de barreiras energéticas ao longo da coordenada de reação pode fazer com que a amostragem conformacional seja pobre em certas posições da coordenada de reação. Uma estratégia para ultrapassar essa limitação é usando um método conhecido como *umbrella sampling* (Torrie e Valleau, 1977). Neste método é introduzido um potencial que vai restringir as variações na coordenada de reação a uma posição determinada, garantindo assim uma amostragem numa região específica. A aplicação desta restrição apenas permite uma boa amostragem numa pequena zona da coordenada de reação, para ter uma boa estimativa em todo o domínio de interesse na coordenada de reação é necessário usar diferentes janelas, cada uma com uma restrição numa posição diferente, juntando no final todas as contribuições para obter uma estimativa global do potencial de força média. (Roux 1995) A reconstrução do perfil de PMF das diferentes janelas é feita recorrendo ao método WHAM (*weighted histogram analysis method*) (Kumar et al. 1992) que permite a sobreposição das funções de distribuição de probabilidade, obtendo melhores estimativas da variação de energia livre.

2. Material e métodos

2.1. Modelos Moleculares

2.1.1. Modelos de péptidos

O presente estudo pretende estudar a incorporação de diferentes péptidos correspondentes a epítomos de proteínas existentes na parede celular da *C. albicans* em bicamadas lipídicas. Os péptidos em estudo são sequências de 14 aminoácidos. As sequências dos péptidos em estudo são apresentadas na Tabela 1.

Para se obter a estrutura de referência dos péptidos, foi feita uma busca usando o algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul SF et al. 1990). Este algoritmo compara a sequência de aminoácidos fornecida, com sequências semelhantes disponíveis em bases de dados. Foram obtidas estruturas de referência homólogas para os péptidos, Eno1, Pgc1, Fba e Met6. Finalmente, foi necessário substituir alguns aminoácidos das estruturas obtidas de forma a ter a estrutura para as sequências de aminoácidos pretendidas (Figura 14). A substituição dos resíduos foi feita com recurso ao programa de edição molecular Pymol (Schrodinger L., 2010).

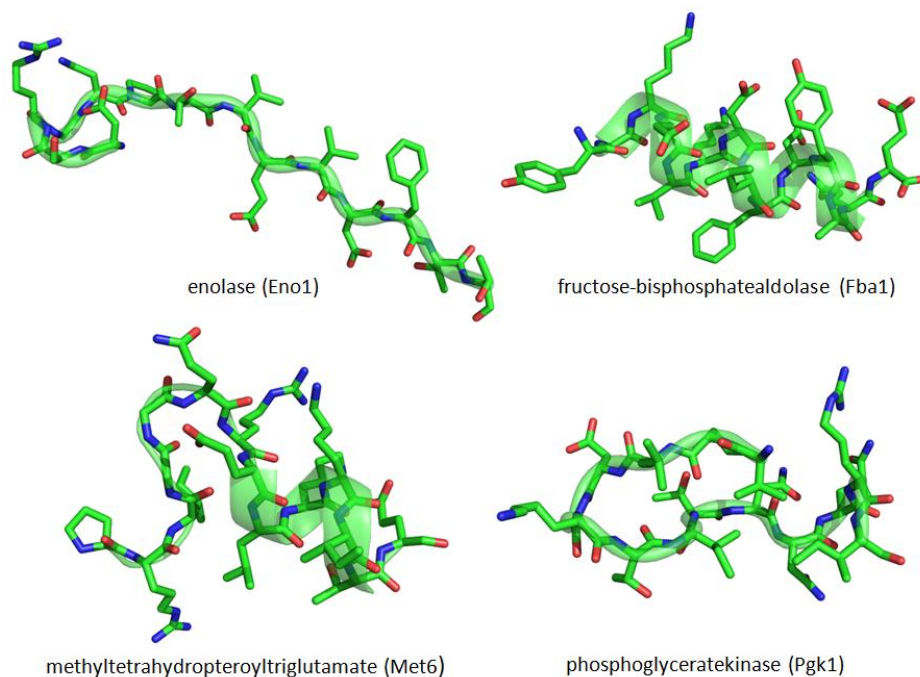


Figura 14 – Modelos dos diferentes péptidos criados a partir de estruturas de referência obtidas por raios-X. A estrutura secundária pode ser visualizada pela representação em *cartoon*. Os átomos e ligações estão representados em *sticks*, usando para os diferentes átomos o seguinte código de cores: verde = carbono; azul = nitrogénio; vermelho = oxigénio. Os átomos de hidrogénio foram omitidos nestas representações

2.1.2. Modelos de membranas

Para a construção do modelo da membrana de monooleína, foi necessário, numa primeira fase construir e parametrizar a estrutura molecular dos lípidos em questão. Usando o programa Pymol, foram feitos modelos para os lípidos, sendo posteriormente parametrizados para o campo de forças Amber03 (Duan *et al.* 2003) que foi utilizado nas simulações efetuadas. Para tal foi necessário fazer uma otimização da geometria e determinar a distribuição de cargas na molécula usando o método RESP (Bayly *et al.*, 1993). A parametrização foi feita com recurso ao programa *antechamber* (Wang J., *et al.*, 2001). O uso do *antechamber* permite criar a topologia, definindo e verificando os parâmetros necessários para o campo de forças.

Os modelos das membranas lipídicas foram criados com o programa packmol (Martínez L. *et al.* 2009), uma ferramenta útil para gerar configurações iniciais. Este programa permite fazer um empacotamento otimizado de moléculas num sistema. Os lípidos foram organizados em bicamada com as caudas orientadas para o interior da bicamada, com as duas monocamadas solvatadas com água. Para equilibrar as membranas, foi efetuada minimização de energia seguida de uma simulação de Dinâmica molecular para equilibração do sistema. Como resultado obteve-se uma membrana equilibrada de monooleína com 170 lípidos por bicamada, solvatada por 3326 moléculas de água (Figura 15).

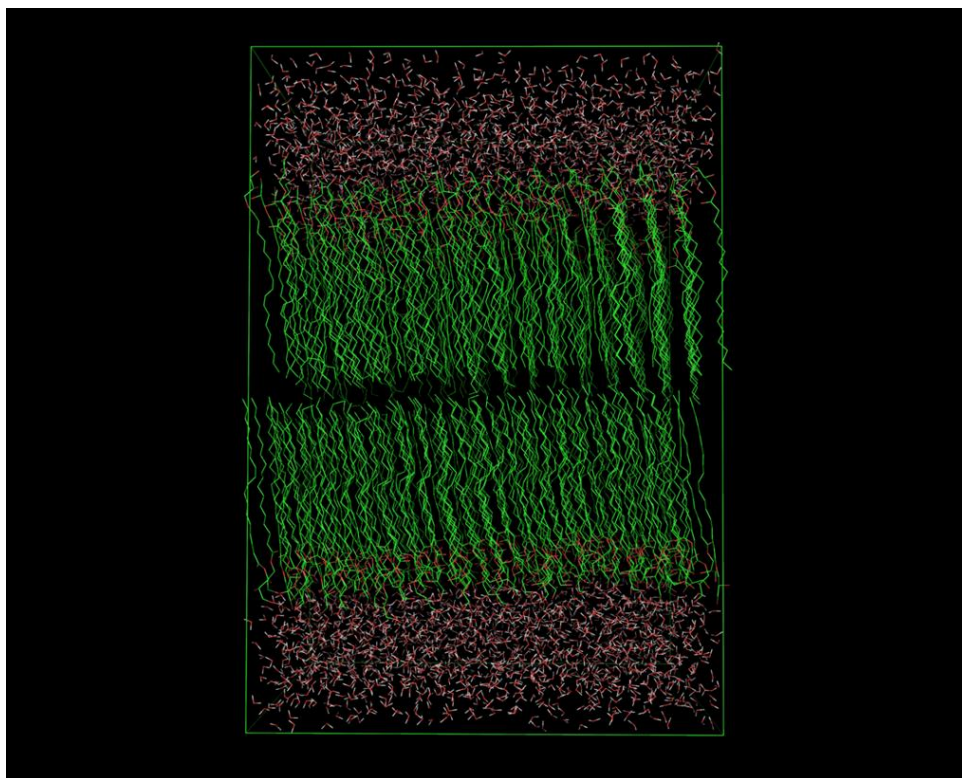


Figura 15 - Membrana de monooleína composta por um total de 170 lípidos igualmente distribuídos nas duas monocamadas, solvatada por 3326 moléculas de água após uma simulação de equilíbrio.

2.1.3. Sistemas

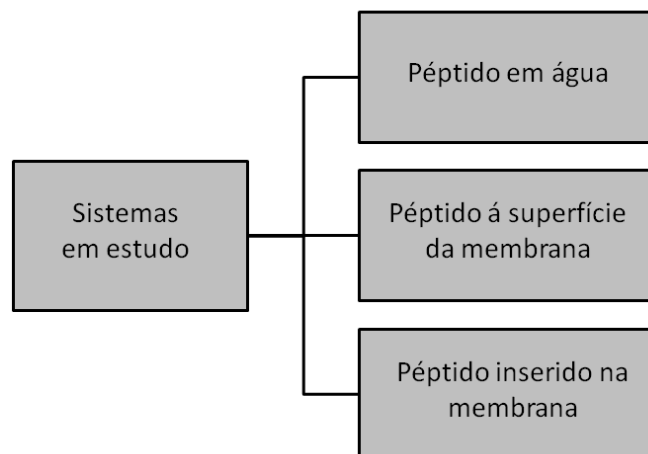


Figura 16 - Sistemas utilizados para o estudo da inserção dos diferentes péptidos em membrana

Foram preparados vários sistemas para o estudo da inserção dos péptidos Eno1, Pgc1, Fba e Met6, na membrana de monooleína. Os sistemas preparados, incluem os péptidos em água, inseridos á superfície da membrana e inseridos no interior da membrana. Em todos estes sistemas usou-se o modelo de água Tip3P, adequado ao campo de forças Amber.

Os péptidos utilizados não têm carga neutra, como tal foi necessário adicionar iões aos sistemas criados para que a carga global do sistema seja neutra. Aos sistemas com os péptidos Eno1 e Fba ambos com duas cargas negativas foram adicionados dois iões Na^+ . O péptido Met6 apresenta duas cargas positivas sendo adicionado a todos os sistemas com esse péptido dois iões Cl^- para neutralizar a carga. O péptido Pgc1 apresenta uma carga positiva, sendo adicionado um ião Cl^- em todos os sistemas em que está presente.

Para os péptidos em água usou-se como célula unitária o dodecaedro rômbo dimensionado para garantir uma camada de solvatação mínima de 1nm (Figura 17 (A)). Os sistemas com os péptidos á superfície e inseridos na membrana usaram a membrana de monooleína equilibrada anteriormente (Figura 17 (B) e (C)). Nestes últimos dois sistemas os péptidos foram inseridos manualmente, removendo-se todos

as moléculas do meio envolvente que estivessem sobrepostos ao péptido ou na vizinhança a uma distância inferior a 2 Å. Aos péptidos inseridos à superfície da membrana foram removidas moléculas de água que se encontravam na situação descrita anteriormente. Os péptidos inseridos no interior da membrana foram colocados junto o interface membrana/água, removendo-se o número mínimo de lípidos necessário, ocupando apenas uma monocamada da membrana. No caso particular da inserção do péptido Eno1 no interior da membrana, foi usado um método distinto. Devido às características estruturais, este péptido ocupa as duas monocamadas da membrana. Para inserir o eno1, seria necessário remover uma maior quantidade de lípidos, para permitir a sua inserção completa na membrana, o que implica uma maior destabilização da membrana. Para tal foi usado um método (Wolf *et al.* 2010) que insere o péptido com dimensões reduzidas, minimizando o número de lípidos que é necessário remover, procedendo posteriormente a um redimensionamento do péptido com uma simulação curta de dinâmica molecular até se obter a sua dimensão original. Desta forma a perturbação da membrana é reduzida, sendo necessário apenas uma simulação curta de dinâmica molecular para reequilibrar a membrana.

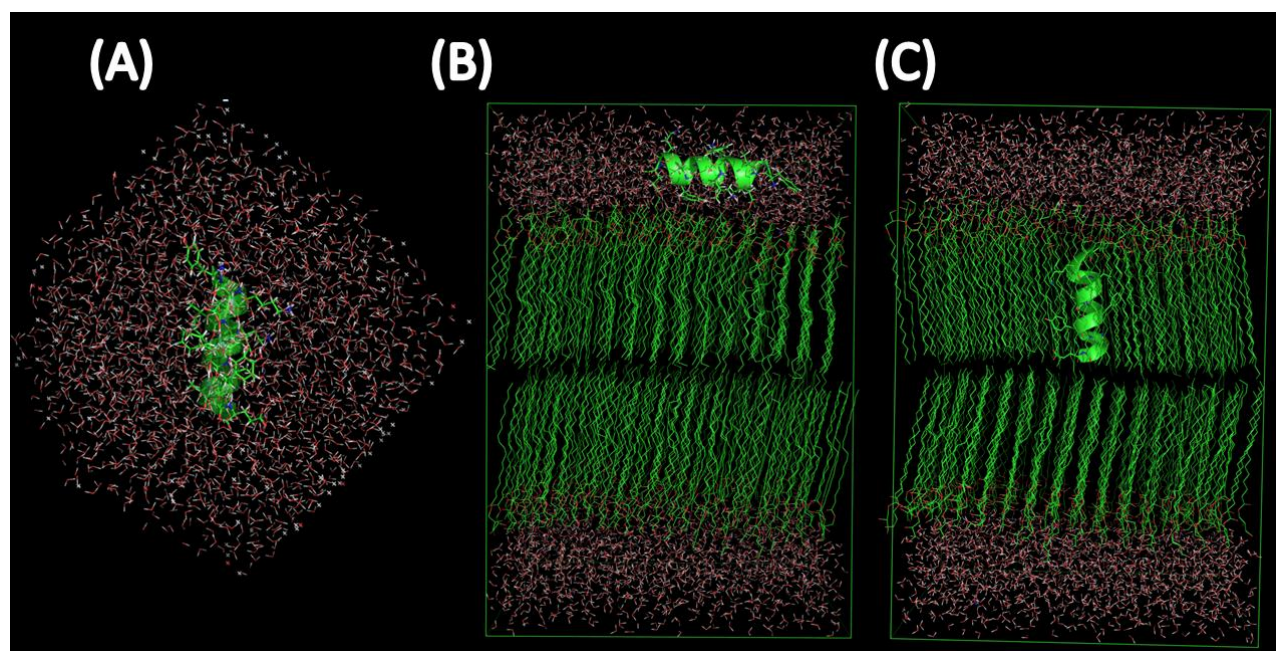


Figura 17 - Exemplos dos sistemas utilizados: (A) Péptido em água, (B) Péptido á superfície da membrana lipídica, (C) Péptido inserido na membrana

2.1.4. Dinâmica Molecular



Figura 18 - procedimento usado em simulações de Dinâmica Molecular

Partindo de uma configuração inicial, são necessários alguns passos, para se poder fazer uma simulação de Dinâmica Molecular (Figura 18). Numa primeira fase submete-se o sistema a uma minimização de energia, seguido de uma fase de inicialização do sistema, onde são geradas as velocidades iniciais do sistema e onde é feita uma equilibração do sistema. Finalmente, segue-se a fase de produção que consiste numa simulação mais prolongada de forma a obter-se uma boa amostragem conformacional do sistema.

Todas as simulações foram feitas com o pacote de simulação por dinâmica molecular GROMACS 4.5.4 (“GRONingen MACHine for Chemical Simulations”) (van der Spoel *et al.*, 2005). Para a minimização de energia usou-se o método *steepest descent*. A minimização de energia foi feita em três passos, num primeiro passo foram aplicadas restrições com uma constante de força $10^6 \text{ kJmol}^{-1}\text{nm}^{-2}$ a todos os átomos dos péptidos, no segundo passo, restringiram-se apenas os carbonos- α com a mesma constante de força e finalmente o último passo de energia foi feito sem aplicar restrições. A inicialização do sistema passa por uma equilibração através de uma pequena simulação de Dinâmica Molecular sendo também inicializadas as velocidades do sistema. A equilibração é feita em dois passos de 100ps aplicando restrições aos mesmos grupos de átomos usados na minimização de energia. Finalmente a fase de produção consistiu numa simulação de 100ns sem restrições aplicadas.

As simulações de Dinâmica Molecular foram feitas para uma temperatura de 310K e uma pressão de 1atm. Estas condições foram garantidas usando os banhos

térmico e de pressão de Berensen usando uma constante de acoplamento $\tau=0.1$. Para as simulações em água, o controlo de pressão foi feito isotropicamente, no caso das simulações com membrana o controlo de pressão foi feito em regime semiisotrópico. A integração das equações de movimento foi feita usando o algoritmo *leapfrog*, com um passo de integração de 0,002 ps. Para a constrição de ligações químicas, foi escolhido o algoritmo LINCS. O tratamento das interações eletrostáticas foi feito com método *Particle Mesh Ewald*, limitado as interações Coulomb diretas a um raio de 1nm, usando um espaçamento de grelha de 0.12 nm (fourierspacing = 0.12) e usando uma interpolação de ordem quatro (pme_order = 4). Para as interações de van der Waals foi usado um esquema de *cut-off*, com um raio de 1nm.

Para os sistemas criados dos péptidos em água, e péptidos á superfície da membrana foram feitas 5 réplicas. Para cada réplica foi usada a mesma configuração inicial, alterando apenas as velocidades iniciais do sistema. Desta forma o sistema evolui de maneira diferente para cada réplica, aumentando assim a amostragem conformacional. No caso dos sistemas com os péptidos não foram feitas réplicas, isto prende-se ao fato do péptido não ter tantos graus de liberdade, por estar inserido num meio anisotrópico, limitando assim as conformações que pode adotar.

2.1.5. Potencial de força média

Para se obter o perfil do potencial de força média do processo de inserção dos péptidos na membrana usou-se o método de amostragem *umbrella sampling*.

As simulações feitas neste estudo usaram os sistemas equilibrados dos péptidos inseridos nas membranas criados anteriormente para as simulações de Dinâmica Molecular.

Num primeiro passo foi necessário deslocar os péptidos na direção perpendicular à superfície da membrana (direção do eixo z) de forma a obterem-se diversas configurações do sistema que descrevam um movimento dos péptidos desde o interior da membrana, até a sua completa remoção. Para tal foram feitas simulações de dinâmica molecular usando um potencial harmónico aplicado no centro de massa dos péptidos e uma restrição aplicada com uma constante de força de $10^5 \text{ kJmol}^{-1}\text{nm}^{-2}$ apenas no eixo z aos átomos da cabeça polar dos lípidos da membrana, para não haver deformação da membrana durante a deslocação dos péptidos. A aplicação deste potencial vai obrigar os péptidos a deslocarem-se na direção pretendida. O potencial harmónico foi aplicado com uma constante de elasticidade $1000 \text{ kJmol}^{-1}\text{nm}^{-2}$ e uma taxa de deslocação de 0.01 nm por ps. na direção do centro geométrico da membrana, deslocando os péptido para o interior da membrana e na direção oposta para remover o péptido da membrana na totalidade pela monocamada superior, assim como está representado na Figura 19. Este procedimento foi aplicado para os péptidos fba, met6 e pgk1. O péptido enol, ao contrário do que acontece com os restantes péptidos, foi inserido na membrana ocupando as duas monocamadas da membrana, devido á sua estrutura alongada. Para este péptido utilizou-se o mesmo tipo de procedimento, descrito anteriormente com a diferença do péptido ter sido removido na direção da monocamada superior da membrana e também foi removido na direção oposta atravessando a monocamada inferior da membrana até ser removido.

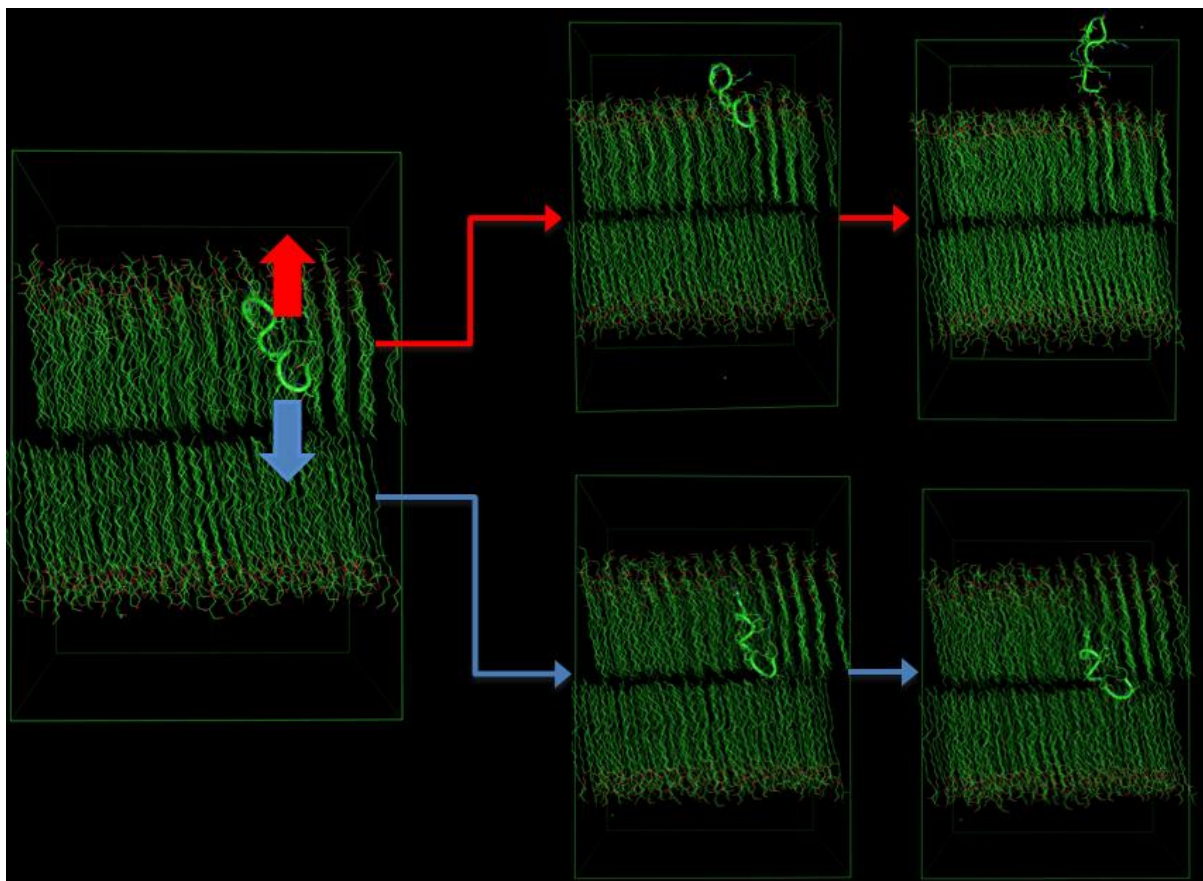


Figura 19 – Aplicação de um potencial harmónico no centro de massa do péptido aplicado na direção do centro geométrico da membrana (representado pela seta azul) e no sentido oposto até a sua completa remoção a membrana (representado pela seta vermelha)

Criadas as configurações iniciais, foram selecionados diferentes *frames* com diferentes distâncias entre os centros de massa da membrana e dos péptidos, usando configurações com um espaçamento de aproximadamente 2 Å. Cada um destes *frames* foi usado com uma janela de simulação de *umbrella sampling*. Para cada janela foi feito um passo de equilíbrio de 100 ps seguido de uma simulação de produção de 10 ns. Para estas simulações foi aplicado um potencial harmónico com uma constante de elasticidade $1000 \text{ kJmol}^{-1}\text{nm}^{-2}$, aos péptidos, restringindo-os a uma distância fixa definida pela distância inicial entre os centros de massa dos péptidos e da membrana. Foram também aplicadas restrições no eixo z com uma constante de força $10^5 \text{ kJmol}^{-1}\text{nm}^{-2}$, a átomos da cabeça polar dos lípidos da membrana.

De forma a obter o potencial de força média ao longo da coordenada de reação usou-se o método WHAM (Kumar et al. 1992). Nesta fase foi possível encontrar lacunas existentes na amostragem, sendo necessário criar novas janelas para colmatar as falhas existentes.

No final foram usadas 24 janelas para a obtenção do potencial de força média do péptido eno1 removido pela monocamada inferior da membrana, 20 janelas para a remoção do enol pela monocamada superior, 23 janelas para o fba, 18 met6 e 21 para o pgk1.

3. Análise de Resultados

Simulações de PMF

Para se obter a variação da energia livre do processo de inserção dos diferentes péptidos em membrana lipídica, usou-se o método de amostragem *umbrella sampling*. Os péptidos foram translocados ao longo da membrana através da aplicação de uma força externa no seu centro de massa e foram criadas várias janelas de simulação para a amostragem ao longo desta coordenada reacional.

Numa primeira abordagem vão ser analisados algumas *frames* correspondentes a algumas das janelas utilizadas nas simulações de *umbrella sampling*. Foi dada preferência às *frames* correspondentes às distâncias entre os centros de massa do péptido e membrana com os valores 1.5, 2.5 e 4 nm, correspondendo às posições do péptido inserido na membrana junto à interface grupo apolar (GA)/grupo polar (GP) da membrana, o péptido com o centro de massa localizado no GP e o péptido removido da membrana, respetivamente.

Na Figura 20 estão representados várias *frames* correspondentes ao sistema com o péptido Enol inserido na membrana de monooleína. Para este péptido foram feitas duas simulações, nas quais se translocou o péptido pela monocamada inferior (Figura 20 A, B e C) e pela monocamada superior (Figura 20 D, E e F) da membrana de monooleína.

Na monocamada inferior, a d_{CM} : -1.5 nm o péptido Enol tem o C-terminal exposto à interface membrana/água (Figura 20 A). Para d_{CM} : -2.5 nm (Figura 20 B) o centro de massa do péptido encontra-se no centro do grupo polar da membrana, ficando o péptido parcialmente inserido na membrana, com alguns resíduos do C-terminal totalmente expostos ao meio aquoso (S). Para d_{CM} : -4 nm (Figura 20 C) o péptido já se encontra totalmente removido da membrana, no entanto ainda é permitido o contacto de alguns resíduos do N-terminal com a membrana.

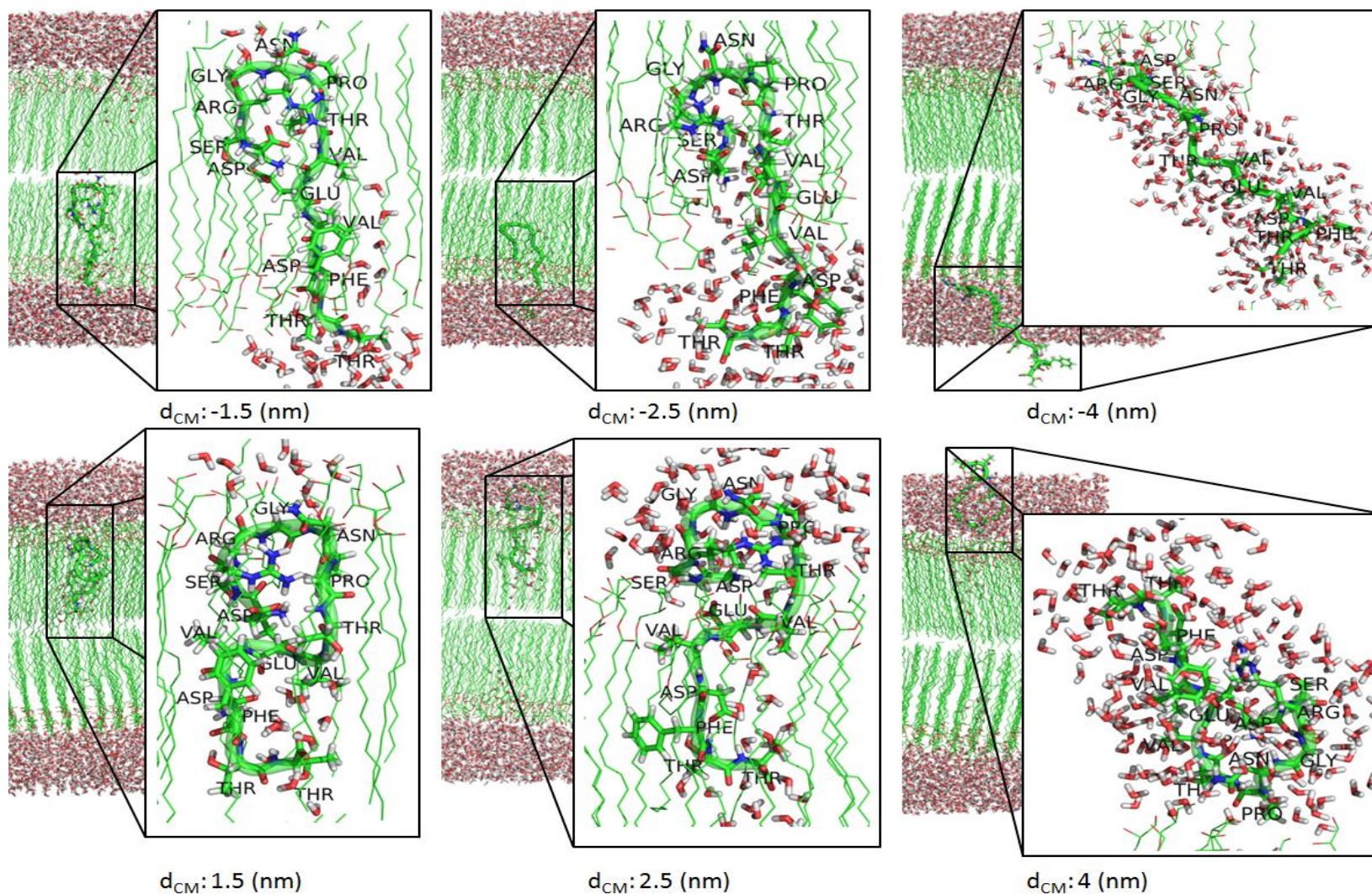


Figura 20 - Representação de *frames* de diferentes janelas usadas no cálculo do PFM da inserção do péptido Enol na membrana de monooleína, usando a técnica de *umbrella smpling*. Estão representados as *frames* para diferentes distâncias entre o centro de massa da membrana e do péptido (d_{CM}). (A) d_{CM} : -1.5 nm; (B) d_{CM} : -2.5 nm; (C) d_{CM} : -4 nm (D); d_{CM} : 1.5 nm; (E) d_{CM} : 2.5 nm; (F) d_{CM} : 4 nm.

Na mesma figura, estão representadas as *frames* correspondentes à migração do péptido pela monocamada superior. A d_{CM} : 1.5 nm (Figura 20 D) o péptido encontra-se quase totalmente inserido no GA da membrana, com alguns resíduos do N-terminal em contacto com o GP. Para d_{CM} : 2.5 nm (Figura 20 E) o péptido encontra-se distribuído pela membrana e pelo solvente aquoso, com o N-terminal exposto ao solvente e ao GP da membrana. O C-terminal encontra-se distribuído entre os grupos polar e apolar da membrana. A d_{CM} : 4 nm (Figura 20 F), tal como na remoção do péptido pela monocamada inferior, o péptido fica totalmente exposto ao solvente, adotando orientações que permitiam o contacto do N-terminal com a membrana.

Verificou-se, que mesmo com o centro de massa do péptido localizado no limite da célula de simulação, algumas conformações adotadas permitiam o contacto com a membrana, não conseguindo assim uma situação correspondente ao péptido estar apenas rodeado de moléculas de água.

No interior da membrana, é conservado um N-terminal *turn*, que parece favorecer o contacto entre as cadeias laterais dos resíduos polares ou com carga (como é o caso dos resíduos Asp^- , Arg^+ , Ser, Asn, Thr, Glu^-), em particular estabelece-se uma ligação iónica entre o 1- Asp^- e 3- Arg^+ e uma ligação iónica entre a cadeia lateral do 9- Glu^- e o grupo amina do N-terminal. O mesmo não acontece com o C-terminal, na sua configuração inicial, os resíduos têm as cadeias laterais expostas ao meio envolvente, quando inseridos em posições mais interiores do GA, tal como se verifica nas *frames* para d_{CM} : 1.5 e 2.5 nm (Figura 20 D e E), há uma mudança de conformação. Esta mudança de conformação parece proteger principalmente o resíduo 11- Asp^- afastando a cadeia lateral das cadeias alifáticas do GA. Observa-se que C-terminal, mantém-se rodeado de moléculas de água, quando inserido no grupo apolar da membrana, isto permite hidratar os resíduos polares (Thr) e as cargas inseridas (Asp^- e o grupo carboxilo do C-terminal). Este efeito é observado durante a migração do C-terminal da monocamada inferior para a monocamada superior da membrana. O mesmo tipo de efeito é verificado no N-terminal, no entanto não é tão pronunciado como no caso do C-terminal. De acordo com observações feitas por MacCallum J. (2008) e os seus colaboradores num estudo da distribuição de cadeias laterais de resíduos em membrana lipídica, a internalização de resíduos polares e de resíduos com carga é acompanhado da entrada de moléculas de água, que permitem a sua

hidratação. Este efeito é mais pronunciado nos resíduos com carga que conseguem manter a hidratação até posições mais internas da membrana, verificando-se que este efeito se dissipa mais precocemente nos resíduos polares. Outro estudo semelhante levado a cabo por Johansson e Lindahl (2008) mostram que resíduos como Asp⁻, Glu⁻, Arg⁺ e Lys⁺ conseguem preservar a hidratação até ao centro da membrana, contrariamente ao que se observa com resíduos polares neutros (Gln, Asn, Tyr), que na migração para o centro da membrana perdem significativamente a hidratação. Estas observações vão de encontro ao que foi verificado na internalização do C-terminal. Por outro lado o N-terminal não verifica um efeito tão pronunciado, muito provavelmente devido às ligações iónicas estabelecidas. O estabelecimento de ligações iónicas é energeticamente mais favorável do que manter as cargas separadas. Wimley *et al.* (1996), num estudo de energias de solvatação de aminoácidos num sistema água/octanol usando pentapéptidos, verificou que sistemas com Arg⁺ e Lys⁺ que formavam ligação iónica com o C-terminal resultava numa redução de energia livre relativamente a pares de cargas que não interagissem. Outro estudo, usando uma hélice transmembranar modelo, sugere que a formação de ligações iónicas entre os resíduos Arg⁺ e Lys⁻, é favorável para a inserção em membrana, ao passo que as cargas separadas tendem a retirar parcialmente a hélice da membrana (Chen-Ni Chin e Gunnar von Heijne 2000). Outro estudo efetuado por dinâmica molecular com pentapéptidos em diferentes interfaces por Marcela (2003) e seus colaboradores suportam a ideia que as ligações iónicas são mais fortes em meio hidrofóbico, nomeadamente em bicamada lipídica. Esta ideia pode sugerir a razão por que a inserção do N-terminal no GA não arrasta um número de moléculas de água tão elevado como o C-terminal. A introdução de moléculas de água na vizinhança do N-terminal destabiliza as ligações iónicas pelo que, deve ser energeticamente mais favorável manter as ligações iónicas, do que introduzir moléculas de água no interior da membrana para hidratar as cargas separadas.

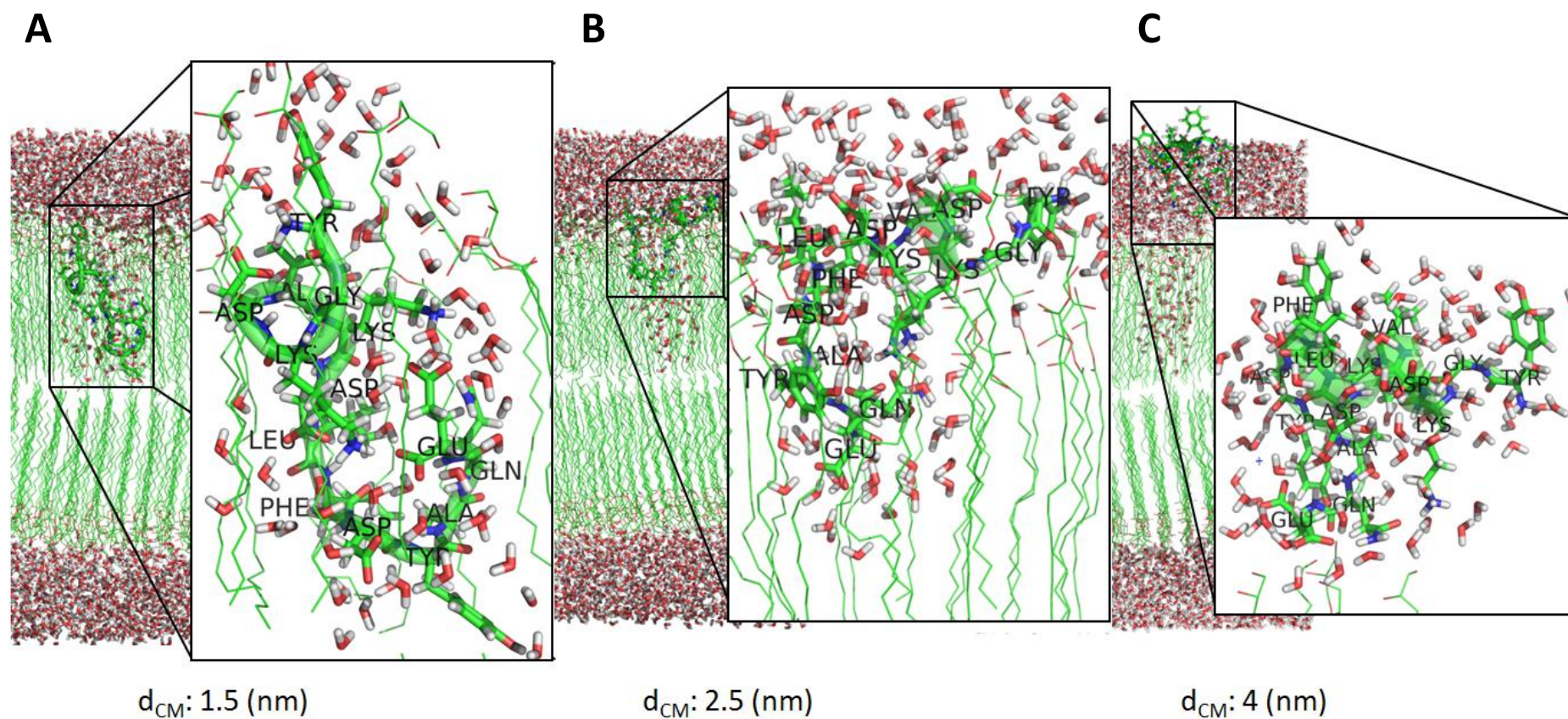


Figura 21 - Representação de *frames* de diferentes janelas usadas no cálculo do PFM da inserção do péptido Fba na membrana de monooleína, usando a técnica de *umbrella smpling*. Estão representados as *frames* para diferentes distâncias entre o centro de massa da membrana e do péptido (d_{CM}). (A) $d_{CM}: 1.5 \text{ nm}$; (B) $d_{CM}: 2.5 \text{ nm}$; (C) $d_{CM}: 4 \text{ nm}$.

Na Figura 21, estão representados várias *frames* correspondentes ao sistema com o péptido Fba inserido na membrana de monooleína. A d_{CM} :1.5 nm (Figura 21 A), o N-terminal encontra-se em contacto com o grupo polar da membrana, ficando o C-terminal totalmente inserido no grupo apolar. A d_{CM} :2.5 nm (Figura 21 B) o péptido encontra o seu centro de massa no centro do GP, encontrando-se N-terminal na interface GP/S e o C-terminal distribuído entre os grupos GP e GA. A d_{CM} : 4 nm (Figura 21 C), o péptido já se encontra removido da membrana.

No interior do GA o péptido adota conformações em *random coil*, o que favorece algumas interações específicas entre as cadeias laterais de alguns resíduos, nomeadamente ligações iónicas entre diferentes resíduos, o par 6-Lys⁺, 14-Glu⁻, o par de resíduos 3-Asp⁻ e 7-Lys⁺, assim como também entre um resíduo 4-Asp⁻ e o grupo amina do N-terminal. No GA da membrana, tem um efeito estabilizador das ligações iónicas, de acordo no estudo efetuado por Marcela (2003) e seus colaboradores. A inserção do péptido no GA é acompanhada da inserção de moléculas de que hidratam o péptido no interior da membrana assim como foi observado para o péptido Enol. O péptido Fba contém na sua sequência vários resíduos com carga, nomeadamente 3 resíduos Asp⁻, 1 resíduo Glu⁻ e 2 resíduos Lys⁺. Neste péptido nem todos os resíduos carregados conseguem estabelecer ligações iónicas, havendo sempre cargas separadas, e tal como foi ilustrado por MacCallum J. (2008) e os seus colaboradores, o efeito da hidratação por moléculas de águas é muito pronunciado e estável quando se introduzem resíduos carregados no núcleo hidrofóbico de uma bicamada lipídica. Daí verificar-se, a inserção de moléculas de água até posições próximas do centro do GA. Em cada um dos terminais do péptido Fba encontra-se um resíduo de Tyr, este resíduo é conhecido como desempenhando um papel de âncora de proteínas, por preferir situar-se na zona interfacial da membrana (Deol *et al.*, 2004). Estudos de dinâmica molecular mostram que Tyr orientam-se perpendicularmente á superfície da membrana com o grupo hidroxilo orientado para a interface lípido/água (Tieleman P.D. *et al* 1998). O mesmo é observado com o péptido inserido no GA, em que a 1-Tyr do N-terminal, se mantém na interface GP/S, mantendo uma orientação perpendicular á superfície da membrana. Verifica-se a adesão do péptido à superfície da membrana a d_{CM} :2.5 nm (Figura 21 B), nesta janela de simulação a parte do péptido que se encontra na interface GP/S, correspondente ao N-terminal, adota uma orientação quase

paralela a superfície da membrana, assim como também adota um motivo em α -hélice. A Lys⁺ é conhecida por ter uma boa capacidade de orientar a cadeia lateral de forma a que a parte apolar se mantenha num meio hidrofóbico, e a parte polar num meio hidrofílico (Johansson et al. 2006). Neste caso observa-se na *frame* a d_{CM}:2.5 (Figura 21 B) que as Lys⁺ do N-Terminal se orientam para o interior da membrana, provavelmente esta orientação favorece o estabelecimento de ligações de hidrogénio com o grupo carbonilo da membrana que se encontra na interface GA/GP e que pode funcionar como aceitador, ou o estabelecimento de ligações intramoleculares. Para d_{CM}:4 nm (Figura 21 C), o péptido adota conformações e uma orientação que favorecem o contacto com a superfície da membrana, sendo permitido o contacto de ambos os terminais, ao mesmo tempo também é visível a adoção de conformações que conservam um motivo em α -hélice. Após a remoção do péptido mantém-se um pequeno canal de água na monocamada superior da membrana, isto deve-se simplesmente ao fato das moléculas de água estarem a ocupar a lacuna originada pela remoção do péptido.

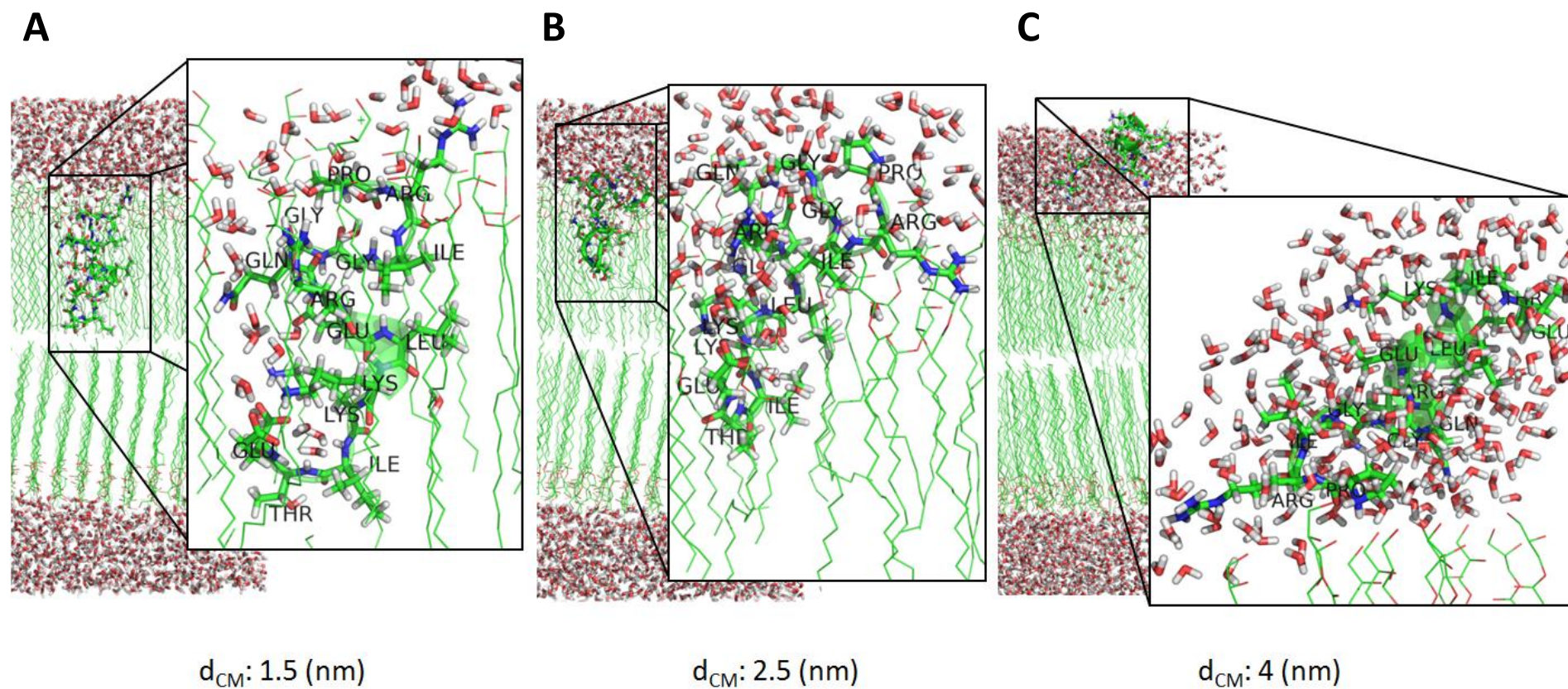


Figura 22 - Representação de *frames* de diferentes janelas usadas no cálculo do PFM da inserção do péptido Met6 na membrana de monooleína, usando a técnica de *umbrella smpling*. Estão representados as *frames* para diferentes distâncias entre o centro de massa da membrana e do péptido (d_{CM}). (A) $d_{CM}: 1.5 \text{ nm}$; (B) $d_{CM}: 2.5 \text{ nm}$; (C) $d_{CM}: 4 \text{ nm}$.

A Figura 22 tem representações de diferentes *frames* correspondentes ao sistema com o péptido Met6 inserido na membrana de monooleína. Quando inserido na membrana a d_{CM} : 1.5 (Figura 22 A), o péptido encontra-se quase totalmente localizado na região apolar da membrana, com apenas alguns resíduos do N-terminal em contacto com o grupo polar. A d_{CM} : 2.5 nm (Figura 22 B) o N-terminal encontra-se na interface GP/S e o C-terminal encontra-se distribuído entre os grupos polar e apolar da membrana. A d_{CM} : 4 nm (Figura 22 C) o péptido encontra-se totalmente removido da membrana.

Quando inserido no GA, o péptido apresenta conformações que favorecem a interação entre as cadeias laterais de alguns resíduos, verifica-se por exemplo o estabelecimento de uma ligação iónica entre os resíduos 10-Lys⁺, 11- Lys⁺ e 14-Glu⁻ do C-terminal, também é possível observar um motivo em α -hélice no C-terminal. A d_{CM} : 2.5 nm verifica-se uma adesão do N-terminal à superfície da membrana, adotando uma orientação paralela à superfície do péptido verificando-se a restrição deste terminal à interface GP/S. Em contacto com a membrana, as cadeias laterais de Arg⁺ do N-terminal, tendem a orientar-se preferencialmente para a interface GP/S. Tal como acontece com a Lys⁺, a Arg⁺ também tem uma boa capacidade de orientar a sua cadeia lateral para estabelecer interações específicas (Johansson *et al.* 2006). Quando removido da membrana (Figura 22 C) o C-terminal parece conservar um motivo em α -hélice. O N-terminal nesta posição adota conformações em *random coil*. Dependendo da orientação do péptido, verifica-se algum contacto com a superfície da membrana.

Como foi observado nas situações anteriores, o péptido quando inserido no interior da membrana rodeia-se de moléculas de água, que hidratam as cadeias de resíduos polares ou com carga. Na Figura 22 A e B correspondente às d_{CM} : 1.5 e d_{CM} : 2.5 nm é possível observar que existem moléculas de água a hidratarem as cadeias laterais desses resíduos, quando inseridos no grupo apolar da membrana. A d_{CM} : 1.5 (Figura 22 A) é possível ver que o efeito da hidratação do péptido por moléculas de água se dissipa para posições mais interiores do GA, neste caso a Thr do C-terminal não tem moléculas de água na sua vizinhança, esta observação é compatível com a natureza do próprio resíduo. A Thr é conhecida por estabelecer ligações de hidrogénio entre a sua cadeia lateral e o *backbone* do péptido (Johansson *et al.* 2006). Tal como foi referido anteriormente, os resíduos com carga conseguem manter a hidratação

mesmo quando inseridos em posições mais interiores do GA, sendo estes os principais responsáveis pela manutenção do efeito de hidratação por moléculas de água. Verifica-se uma ligeira inclinação do péptido que afasta as cadeias laterais hidrofílicas do péptido da superfície da membrana. Quando entra em contacto com a membrana, o péptido adota orientações que favorece a internalização das cadeias laterais dos resíduos apolares a d_{CM} : 1.5 e d_{CM} : 2.4, verifica-se a orientação das cadeias laterais de resíduos como Leu e Ile para o GA da membrana. Assim como no caso anterior, a remoção do péptido deixou uma lacuna na membrana, que deu origem a um pequeno canal populado por moléculas de água.

Na Figura 23 apresentam-se diferentes *frames* correspondentes a diferentes janelas de simulação utilizadas para o cálculo do PMF para o sistema com o péptido Pgk1 inserido na membrana de monooleína. Para d_{CM} : 1.5 nm (Figura 23 A) o péptido encontra-se inserido no GA da membrana, com ambos os terminais com resíduos em contacto com o GP. O C-terminal encontra-se parcialmente embebido no GP, ficando o N-terminal situado, quase na sua totalidade, no GA. A d_{CM} : 2.5 nm (Figura 23 B) o péptido encontra-se distribuído pelos grupos GA e GP, com a maior porção do C-terminal na interface GP/S. O N-terminal tem uma grande porção inserida no GA. A d_{CM} : 4 nm (Figura 23 C) o péptido encontra-se totalmente removido da membrana.

Quando inserido no GA, a orientação inicial do péptido aproximou muitas das cadeias laterais polares e com carga ao GP, ficando apenas alguns resíduos 7-Thr, 9-Thr, 6-Lys⁺ e 4-Asp⁻, totalmente inseridos no GA (Figura 23 A). No interior do GA verifica-se o estabelecimento de uma ligação iónica entre cadeias laterais dos resíduos 6-Lys⁺ e 4-Asp⁻. Verifica-se a inserção de algumas moléculas de água no GA, que permitem a hidratação dos grupos polares das cadeias laterais de alguns, no entanto, este efeito não é tão pronunciado como nos casos anteriores. O péptido Pgk1 apresenta na sua sequência três resíduos com carga (Arg⁺, Asp⁻, Lys⁺), nas janelas de simulação a d_{CM} :1.5 e 2.5 nm (Figura 23 A e B) os resíduos 4-Asp⁻ e 5-Lys⁺ encontram internalizados no GA e o resíduo 13-Arg⁺ no GP. Tal como foi observado, os resíduos 4-Asp⁻, 6-Lys⁺ formam uma ligação iónica que se mantém no interior do GA, assim como foi referido por Marcela P. (2003) e os seus colaboradores, o estabelecimento de ligações iónicas são mais fortes em meios hidrofóbicos, adicionalmente, o estabelecimento de ligações iónicas pode ser um fator que diminui a energia livre

associada à inserção do péptido em meio hidrofóbico (Chin e von Heijne, 2000). Desta forma será mais vantajoso manter a ligação iónica em relação à inserção de moléculas de água para hidratar as cargas em separado. Outra particularidade da porção do péptido que se encontra nas posições mais interiores do GA é relativa aos resíduos de Thr, para os quais não se observa moléculas de água na sua vizinhança. Este resíduos, tal como já foi referido anteriormente, estabelecem ligações de hidrogénio com o *backbone* do péptido, este comportamento é mais favorável do que inserir moléculas de água para hidratar a cadeia lateral (Johansson e Lindahl, 2006). O N-terminal, contém resíduos que tem facilidade em orientar as cadeias laterais para estabelecer interações específicas, como é o caso da Arg⁺, Gln e Asn, orientando-se preferencialmente para o GP, o que por sua vez diminui o efeito da inserção de moléculas de água. Em todos os meios, não se verifica a formação de nenhuma estrutura secundária, mantendo-se conformações em *random coil*. Verifica-se a formação de um pequeno canal de água na membrana após a remoção do péptido, mais uma vez deva-se ao facto de ficar uma lacuna que antes era preenchida pelo péptido.

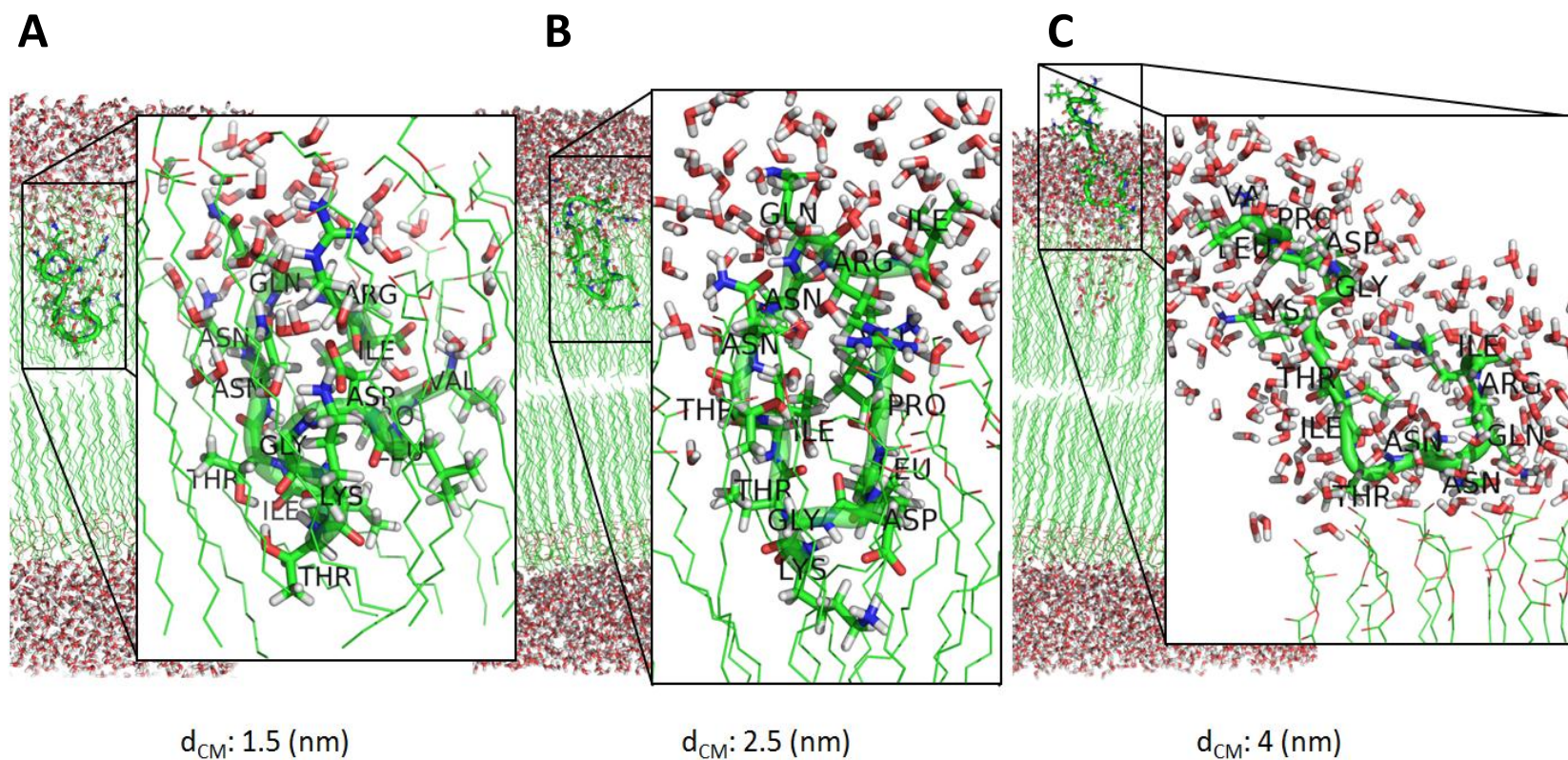


Figura 23 - Representação de *frames* de diferentes janelas usadas no cálculo do PFM da inserção do péptido Pdk1 na membrana de monooleína, usando a técnica de *umbrella smpling*. Estão representados as *frames* para diferentes distâncias entre o centro de massa da membrana e do péptido (d_{CM}). (A) $d_{CM}: 1.5 \text{ nm}$; (B) $d_{CM}: 2.5 \text{ nm}$; (C) $d_{CM}: 4 \text{ nm}$.

3.1.1. PMF

Das simulações de *umbrella sampling*, é possível calcular a variação de energia livre da inserção dos péptidos ao longo da coordenada reacional que atravessa a membrana lipídica. Esta técnica emprega o método WHAM, que permite remover a contribuição do potencial externo aplicado que impôs o deslocamento do péptido ao longo da membrana.

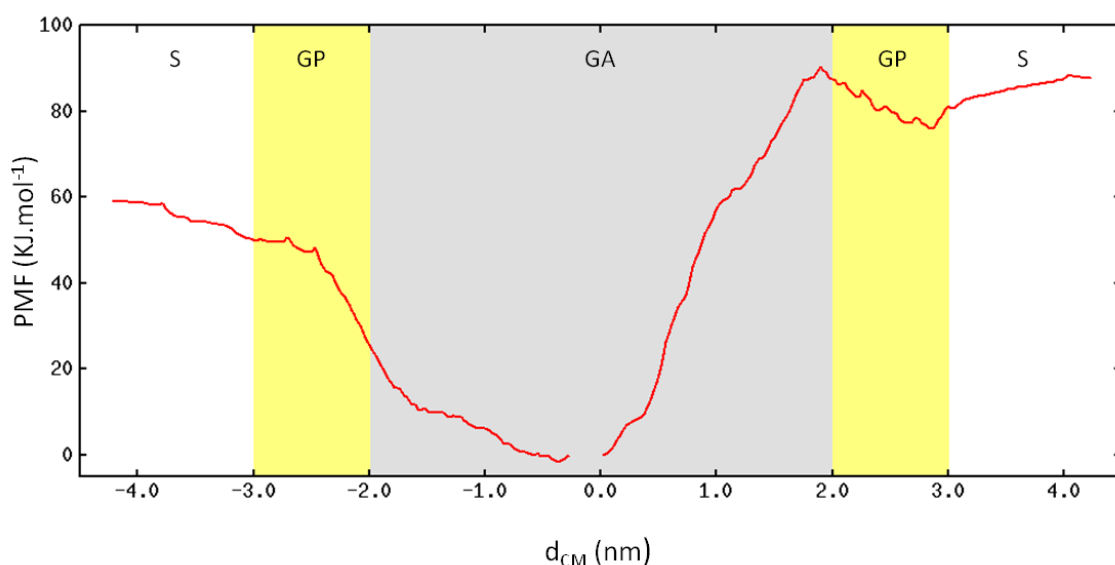


Figura 24 - Perfil de energia livre do péptido Enol em função da distância entre o centro de massa da membrana e do péptido (d_{CM}) ao longo da coordenada de reação z . Estão marcadas áreas correspondentes aos diferentes ambientes encontrados no sistema: o meio aquoso, populado por apenas moléculas de água (S), o grupo polar dos lipídios que formam a membrana (GP) e a parte do sistema onde predomina o grupo apolar da membrana (GA).

O perfil do PMF para o sistema contendo o péptido Enol está representado na Figura 24. O perfil de energia não é simétrico, verificando-se uma variação de energia maior quando se insere o péptido pelo N-terminal comparativamente ao C-terminal. Para as duas situações encontra-se um mínimo de energia no centro da membrana. O perfil de energia para a inserção do péptido pela monocamada inferior apresenta uma variação de energia de aproximadamente 60 kJmol^{-1} . A inserção do péptido pela monocamada superior apresenta uma diminuição de energia com a entrada do péptido na membrana até aproximadamente $d_{\text{CM}} \approx 3 \text{ nm}$, apresentado em seguida um aumento de 20 kJmol^{-1} até $d_{\text{CM}} \approx 2 \text{ nm}$ onde atinge o máximo de energia. De $d_{\text{CM}} \approx 2 \text{ nm}$ até ao centro da membrana há uma diminuição acentuada de energia, verificando-se uma variação de aproximadamente 90 kJmol^{-1} . Estas observações sugerem que é

energeticamente favorável a inserção do péptido na membrana. Em mais detalhe, o perfil de energia sugere que é mais desfavorável inserir o C-Terminal no núcleo hidrofóbico da membrana do que o N-terminal. Por um lado a verifica-se que, a barreira de energia entre $d_{CM} \approx 3$ e $d_{CM} \approx 2$ nm coincide com a entrada do C-Terminal no GA, essa barreira não se encontra na inserção pela monocamada inferior, que corresponde à inserção do péptido pelo N-Terminal. Adicionalmente, avaliando os perfis de energia no domínio apolar da membrana, há uma variação de energia mais acentuada na monocamada superior em relação à monocamada inferior, o que sugere que há uma penalização energética, que pode estar associada à inserção do C-terminal em posições mais interiores do GA. Este terminal tem na sua sequência aminoácidos polares como é o caso da 13-Thr e 14-Thr, assim como aminoácidos carregados negativamente, como é o caso do 11-Asp⁻ que estão bastante expostos ao solvente. Os trabalhos realizados por Johansson *et al.* (2008) e MacCallum J. *et al* (2008) no estudo distribuição aminoácidos em membrana mostram que, genericamente, a internalização no GA de resíduos polares ou carregados é penalizada pelo aumento da energia livre. Estes aminoácidos apresentam um mínimo de energia no interface GA/GP, com a exceção de Asp⁻ e Glu⁻, que apresentam sempre um aumento da energia com a inserção em bicamada lipídica. Os mesmos autores sugerem que o custo de inserção destes aminoácidos é devido principalmente ao custo entrópico de reter moléculas de água para hidratação. Tal como foi referido anteriormente, o estabelecimento de ligações iónicas observadas no N-terminal pode ser um fator que diminui a penalização associada à inserção de cargas no GA. Por outro lado e comparando com o C-terminal, a migração do N-terminal pelo GA é feita com uma menor internalização de moléculas de água, o que pode justificar a menor penalização energética associada à sua migração pelo GA.

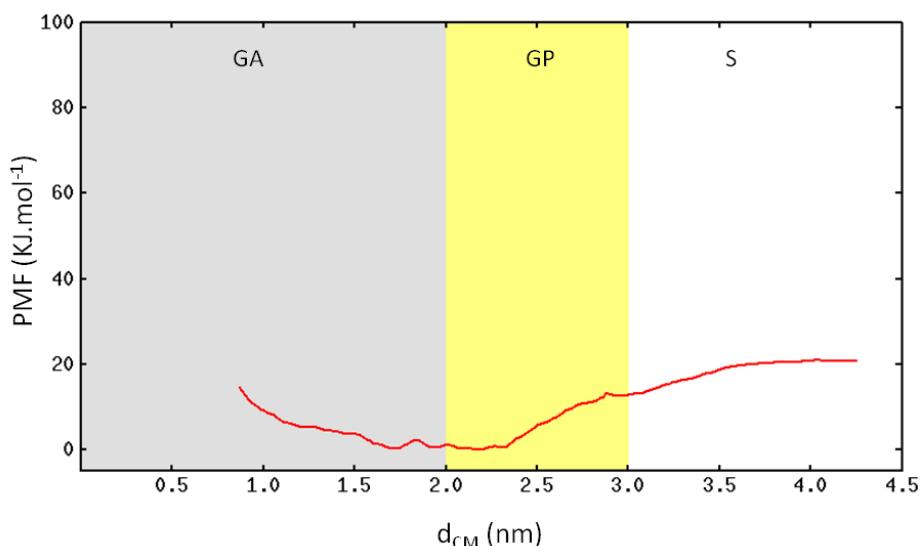


Figura 25 - Perfil de energia livre do péptido Fba em função da distância entre o centro de massa da membrana e do péptido (d_{CM}) ao longo da coordenada de reação z . Estão marcadas áreas correspondentes aos diferentes ambientes encontrados no sistema: o meio aquoso, populado por apenas moléculas de água (S), o grupo polar dos lípidos que formam a membrana (GP) e a parte do sistema onde predomina o grupo apolar da membrana (GA).

O perfil do PMF para o sistema contendo o péptido Fba está representado na Figura 25. Há uma diminuição de energia de aproximadamente 20 kJmol^{-1} com a inserção do péptido na membrana até $d_{CM} \approx 2.4 \text{ nm}$, onde se estabelece um patamar de energia. Quando d_{CM} atinge valores inferiores a 1.5 nm verifica-se um aumento de energia, este aumento pode ser um artefacto induzido pelo sistema inicial utilizado. Este artefacto pode ser originado pelo facto da monocamada inferior ter um maior número de lípidos do que a monocamada superior, pelo que a inserção do péptido nessa monocamada é dificultada por se tratar de uma zona mais compacta, o que se traduz numa barreira de energia que não permite uma avaliação correta do perfil de potencial nessa zona. Por esse motivo, o estudo do perfil de potencial vai ser limitado às zonas interfaciais da membrana.

Em suma, a inserção do péptido Fba é favorecida, não sendo apresentada nenhuma barreira energética que dificulte a inserção. A existência de um patamar de energia sugere que o péptido pode ocupar preferencialmente a zona de interface GP/GP da membrana possivelmente por favorecer o estabelecimento de interações específicas das cadeias laterais do péptido. Outra hipótese prende-se ao custo energético associado à inserção de moléculas de água no GA, podendo ser o fator dominante no valor de energia observado, já que neste caso este efeito é muito

pronunciado. Este péptido tem, na sua sequência, vários resíduos com carga. Como já foi referido anteriormente, o custo de inserir resíduos polares ou com carga está associado ao custo da inserção e manutenção de moléculas de água no GA, no entanto, no caso dos resíduos com carga, este efeito não se dissipa tão precocemente como acontece com os resíduos polares neutros. Num estudo feito acerca da transferência de Arg^+ para membrana, mostra que o custo associado à inserção de vários Arg^+ é aproximadamente o mesmo que a adição de apenas um Arg^+ . O que foi demonstrado, é que o custo associado à inserção de moléculas de água para a hidratação do primeiro Arg^+ inserido, diminui substancialmente o custo da adição de outros Arg^+ , já que todas partilham as mesmas moléculas de água (MacCallum *et al.* 2011). Seguindo esta ideia, e tendo em conta que o patamar de energia verificado é coincidente com a inserção dos resíduos 14-Glu⁻ e 10-Asp⁻ no GA, pode-se sugerir, que a inserção de moléculas de água para a hidratação destes resíduos vai permitir a hidratação de outros resíduos sem um grande custo adicional, o que se vai traduzir num patamar de energia que é dominado pelo custo de inserção e manutenção das moléculas de água no interior da membrana.

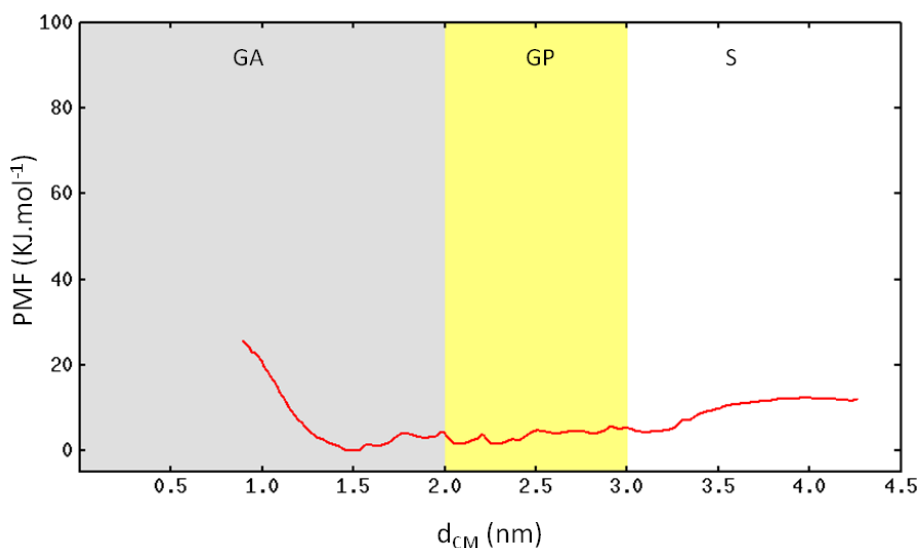


Figura 26 - Perfil de energia livre do péptido Met6 em função da distância entre o centro de massa da membrana e do péptido (d_{CM}) ao longo da coordenada de reação z . Estão marcadas áreas correspondentes aos diferentes ambientes encontrados no sistema: o meio aquoso, populado por apenas moléculas de água (S), o grupo polar dos lípidos que formam a membrana (GP) e a parte do sistema onde predomina o grupo apolar da membrana (GA).

O perfil do PMF para o sistema contendo o péptido Met6 está representado na Figura 26. O perfil de energia para a inserção do péptido em membrana apresenta uma variação de energia pouco acentuada. A deslocação do péptido da água para a região apolar a membrana até a $d_{CM} \approx 1.5$ nm é acompanhada de uma diminuição de aproximadamente 17 kJ.mol^{-1} . Verifica-se um aumento da energia para valores inferiores a $d_{CM} = 1.5$ nm. Este aumento pode ser, tal como se observou para o caso do Fba, um artefacto associado a efeitos estéricos introduzidos pelo sistema inicial utilizado para as simulações de PMF, limitando a análise às zonas de interface.

O perfil de energia obtido sugere uma preferência do péptido a inserir-se na membrana, no entanto este processo de inserção parece ser facilmente reversível, a movimentação do péptido entre os interfaces GA/GP e GP/S não encontra nenhuma barreira energética significativa, o que pode facilitar a migração do péptido nessa zona em ambos os sentidos, encontrando uma ligeira barreira quando se afasta da superfície da membrana. Assim como foi descrito para a Figura 22, este péptido tem a particularidade de conseguir orientar as cadeias dos resíduos apolares para o interior do GA, mantendo as cadeias laterais dos grupos polares orientados em direção do GP. Esta situação parece manter o efeito da inserção de moléculas de água no interior do GA confinado a uma zona restrita, garantindo a hidratação das cadeias laterais dos resíduos polares, ou com carga. Além disso na sua sequência tem vários resíduos que orientam as suas cadeias laterais em direção ao GP como é o caso dos resíduos Arg^+ , Lys^+ , Gln , que têm grande mobilidade (Johansson e Lindahl, 2006), o que permite inserir-se mais na GA mantendo as cargas e grupos apolares no GP. Muito provavelmente estas propriedades do péptido permitem uma grande mobilidade do junto à interface lípido/água.

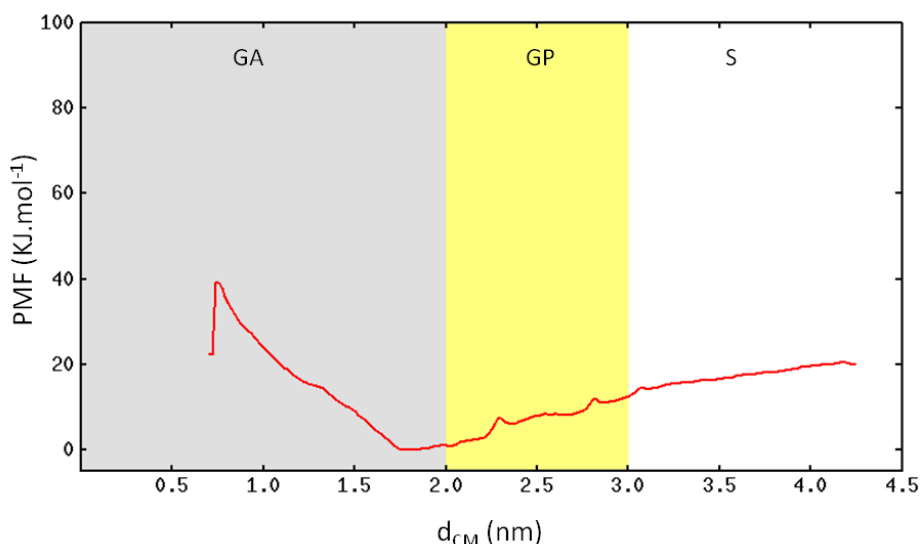


Figura 27 - Perfil de energia livre do péptido Pkg1 em função da distância entre o centro de massa da membrana e do péptido (d_{CM}) ao longo da coordenada de reação z . Estão marcadas áreas correspondentes aos diferentes ambientes encontrados no sistema: o meio aquoso, populado por apenas moléculas de água (S), o grupo polar dos lípidos que formam a membrana (GP) e a parte do sistema onde predomina o grupo apolar da membrana (GA).

O perfil do PMF para o sistema contendo o péptido Pkg1 está representado na Figura 27. O PMF obtido para a inserção do péptido em membrana diminui monotonicamente no percurso que vai desde o péptido se encontrar inserido em água até inserir-se na membrana a $d_{CM} \approx 1.7$ nm, com uma variação de energia de aproximadamente 20 KJ.mol^{-1} . A partir de $d_{CM} \approx 1.7$ nm, em direção do centro da membrana, verifica-se um aumento de energia. Tal como nos casos anteriores, considera-se a existência de um artefacto originado pelo sistema utilizado. Neste sistema o péptido só atinge a monocamada inferior a valores de $d_{CM} < 1.3$ nm (não está ilustrado), daí poder-se considerar o perfil de energia até esta d_{CM} . Desta forma, verifica-se um aumento da energia quando o péptido se afasta do GP em direção a posições mais interiores do GA.

A análise do PMF é limitada às interfaces, não havendo portanto uma descrição do potencial no núcleo hidrofóbico da membrana. A análise do perfil do potencial sugere que o péptido se insere na membrana espontaneamente, não havendo barreiras de energia a ultrapassar, até atingir $d_{CM} \approx 1.7$ nm, onde se verifica uma barreira de energia que dificulta a inserção do péptido em posições mais interiores do GA, sugerindo que o péptido se encontra restringido junto à interface GA/GP. Esta barreira de energia parece estar associada à inserção C-terminal no GA.

3.1.2. Ligações de Hidrogénio

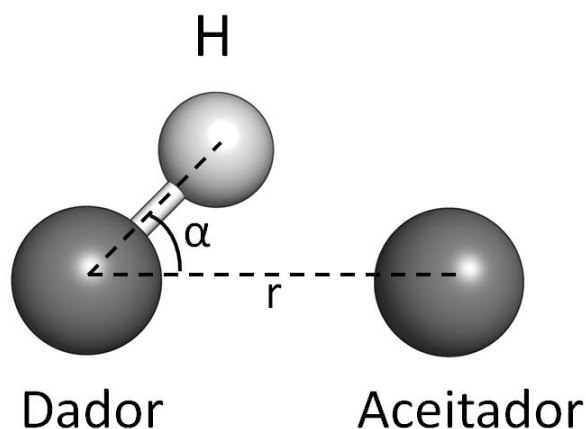


Figura 28 – Critério geométrico utilizado para avaliar as ligações de hidrogénio. Considera-se o estabelecimento de uma ligação de hidrogénio entre um átomo dador e um aceitador para $r \leq 0,35$ nm e $\alpha \leq 30^\circ$.

A análise das ligações de hidrogénio foi feita usando critérios geométricos, ilustrados na Figura 28, sendo r a distância entre o dador e o aceitador, e α o ângulo estabelecido entre o átomo de hidrogénio, o dador e o aceitador. Considerou-se que existe uma ligação de hidrogénio entre átomos dadores e aceitadores para as seguintes condições: $r \leq 0,35$ nm e $\alpha \leq 30^\circ$. Foi determinado o número de ligações de hidrogénio estabelecidas entre o péptido e as moléculas de água do sistema, entre o péptido e a membrana lipídica e as ligações de hidrogénio internas do péptido para todas as janelas de simulação criadas para a amostragem de *umbrella sampling*.

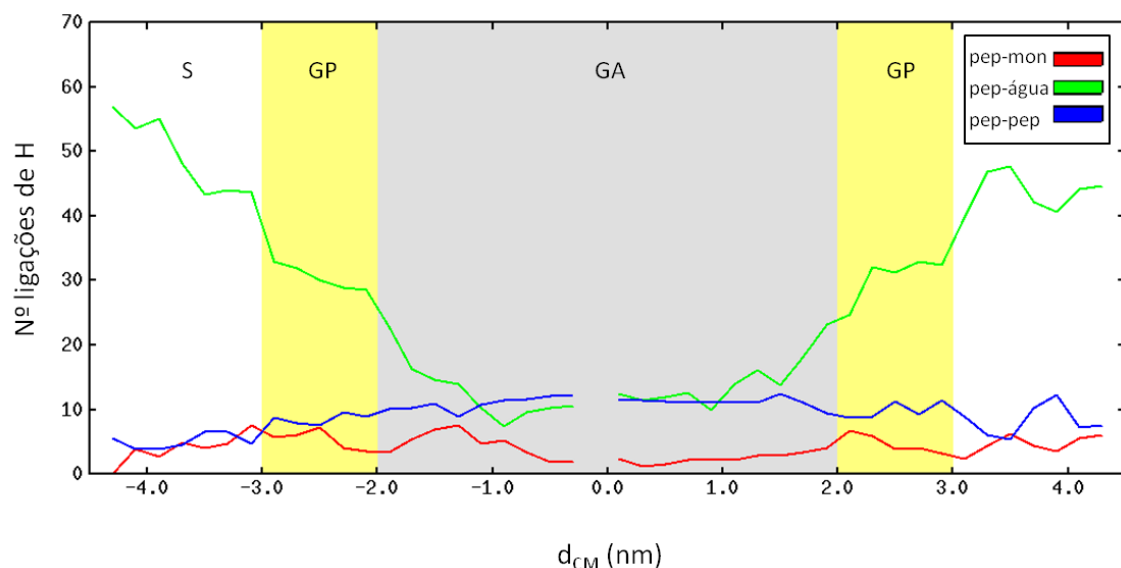


Figura 29 - Numero de ligações de hidrogénio estabelecidas para o sistema com o péptido Enol em função da distância entre o centro de massa da membrana e do péptido (d_{CM}) ao longo da coordenada de reação z . Foi calculada a média das ligações para intervalos de 0.2 nm. Estão representadas as ligações entre o péptido e a membrana (vermelho), as ligações entre o péptido e água (verde) e as ligações internas do péptido (azul). Estão marcadas áreas correspondentes aos diferentes ambientes encontrados no sistema: o meio aquoso, populado por apenas moléculas de água (S), o grupo polar dos lípidos que formam a membrana (GP) e a parte do sistema onde predomina o grupo apolar da membrana (GA).

Na Figura 29 está representado o valor médio das ligações estabelecidas para intervalos de 0.2 nm da distância entre os centros de massa do péptido Enol e a membrana de monooleína. A entrada do péptido na membrana é acompanhada de uma perda significativa de ligações de hidrogénio. Deve-se principalmente à perda de ligações de hidrogénio com as moléculas de água, sendo em alguma medida contrabalançado com o aumento de ligações de hidrogénio internas do péptido, que com a inserção do péptido no interior da membrana, tendem a aumentar. As ligações estabelecidas entre o péptido e a membrana vão variando em função dos resíduos que entram em contacto com o grupo polar da membrana, para d_{CM} compreendido entre -0.3 e -1.5 nm verifica-se um aumento das ligações de hidrogénio entre o péptido e a membrana, o que coincide com a aproximação dos resíduos 13-Thr, 14-Thr e 11-Asp⁺ do C-terminal ao grupo polar da membrana, verificando-se em seguida uma diminuição que acompanha a sua saída para o meio aquoso. Um novo aumento no número de ligações entre o péptido e a membrana surge com a aproximação do N-terminal ao grupo polar da membrana, havendo novamente uma diminuição à medida que o N-terminal abandona a membrana e entra no meio aquoso. Da mesma forma há um aumento das ligações de hidrogénio péptido-membrana do centro até $d_{CM} \approx 2.1$ nm,

onde atinge um máximo local, com aproximação do N-terminal ao grupo polar da membrana, apresentando um novo máximo local a $d_{CM} \approx 3.5$ nm com a aproximação dos resíduos 13-Thr, 14-Thr e 11-Asp⁺ do C-terminal do grupo polar da membrana. Verifica-se sempre alguma interação do péptido com a membrana, em todas as janelas de simulação houve interação de resíduos do péptido com o grupo polar da membrana. Quando inserido no núcleo hidrofóbico, mesmo em posições mais interiores da membrana, verifica-se o estabelecimento de ligações de hidrogénio entre o péptido e a água, isto vai de encontro com as observações feitas na Figura 20, o que ilustra a hipótese de que a inserção do péptido em membrana é acompanhada pela inserção de moléculas de água que hidratam os resíduos polares e os resíduos carregados do péptido. A dessolvatação do péptido é um processo desfavorável, o estabelecimento de ligações de hidrogénio com a membrana e mesmo a possibilidade de se estabelecerem ligações internas podem diminuir a penalização energética associada à dessolvatação do péptido quando este se insere na membrana. Não se consegue, no entanto, estabelecer nenhuma relação direta com o perfil de PMF, não havendo indícios claros de qual é a contribuição energética das ligações de hidrogénio estabelecidas ao longo da coordenada de reação.

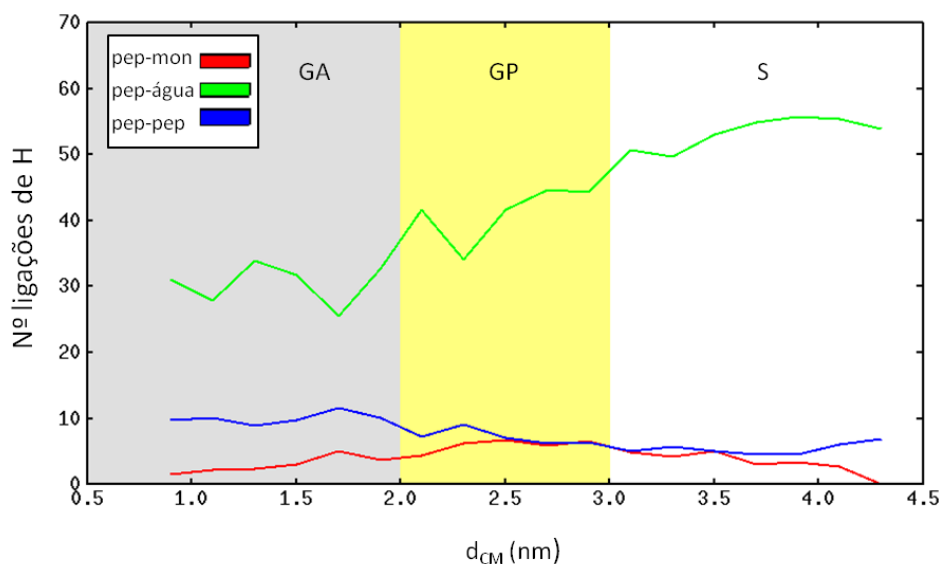


Figura 30 - Numero de ligações de hidrogénio estabelecidas para o sistema com o péptido Fba em função da distância entre o centro de massa da membrana e do péptido (d_{CM}) ao longo da coordenada de reação z . Foi calculada a média das ligações para intervalos de 0.2 nm. Estão representadas as ligações entre o péptido e a membrana (vermelho), as ligações entre o péptido e água (verde) e as ligações internas do péptido (azul). Estão marcadas áreas correspondentes aos diferentes ambientes encontrados no sistema: o meio aquoso, populado por apenas moléculas de água (S), o grupo polar dos lípidos que formam a membrana (GP) e a parte do sistema onde predomina o grupo apolar da membrana (GA).

Na Figura 30 está representado o valor médio das ligações estabelecidas para intervalos de 0.2 nm da distância entre os centros de massa do péptido Fba e a membrana de monooleína. A inserção do péptido em membrana é acompanhada da dessolvatação do péptido, verificando-se uma diminuição acentuada do número de ligações de hidrogénio com moléculas de água, não sendo, no entanto, uma diminuição tão acentuada como no caso do péptido Enol, verificando-se um número de ligações com moléculas de água bastante mais elevado para posições mais internas da membrana. Em oposição verifica-se um aumento do número de ligações de hidrogénio intramoleculares do péptido com a sua inserção no péptido até se encontrar inserido no GA da membrana. Verifica-se um máximo de ligações com a membrana para d_{CM} compreendidos entre 2.5 e 3 nm, nesta zona há um grande contacto com a membrana vai de encontro com o comportamento ilustrado na Figura 21 a $d_{CM}=2.5$ nm, em que o N-terminal se encontra na interface GP/S se mantém paralelo á superfície da membrana, o que se traduz no aumento de ligações de hidrogénio observado. Para valores de $d_{CM}<2.5$ nm estabelece-se um patamar de energia, assim como observado no perfil de PMF (Figura 25). Ao olhar para todas as ligações de hidrogénio estabelecidas, pode-se associar para $d_{CM}<2.5$ nm, em certa medida, uma estabilização da hidratação do péptido, o que pode estar associado ao perfil de PMF observado. Tornam-se evidentes alguns dos mecanismos que permitem ao péptido, diminuir a penalização energética associada à dessolvatação, desde a incorporação de moléculas de água na membrana, assim como o estabelecimento de ligações de hidrogénio intramoleculares, e com o GP da membrana.

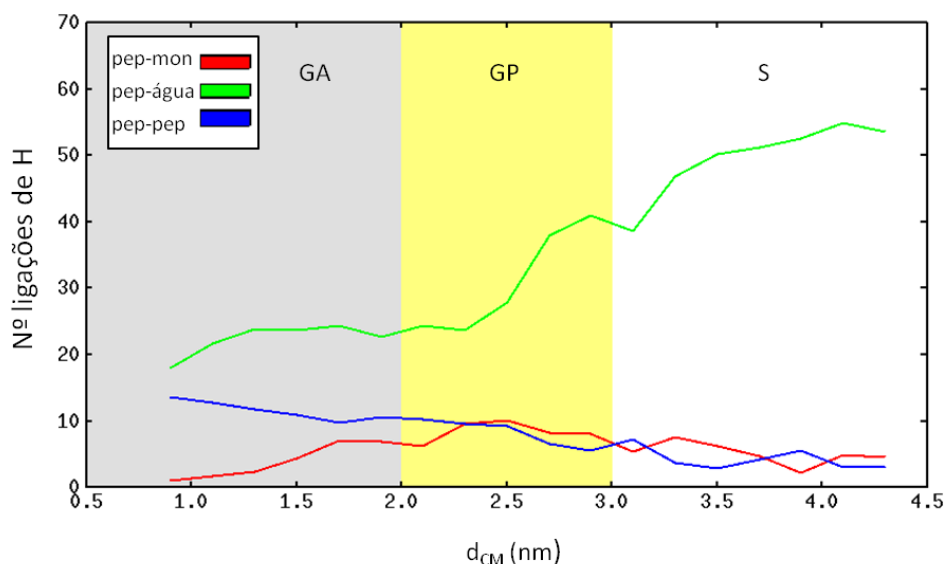


Figura 31 - Número de ligações de hidrogénio estabelecidas para o sistema com o péptido Met6 em função da distância entre o centro de massa da membrana e do péptido (d_{CM}) ao longo da coordenada de reação z . Foi calculada a média das ligações para intervalos de 0.2 nm. Estão representadas as ligações entre o péptido e a membrana (vermelho), as ligações entre o péptido e água (verde) e as ligações internas do péptido (azul). Estão marcadas áreas correspondentes aos diferentes ambientes encontrados no sistema: o meio aquoso, populado por apenas moléculas de água (S), o grupo polar dos lípidos que formam a membrana (GP) e a parte do sistema onde predomina o grupo apolar da membrana (GA).

A análise das ligações de hidrogénio estabelecidas no sistema contendo o péptido Met6 está representada na Figura 31. Foi calculado valor médio das ligações estabelecidas para intervalos de 0.2 nm da distância entre os centros de massa do péptido Met6 e a membrana de monooleína. O número de ligações de hidrogénio estabelecidas com moléculas de água diminui rapidamente com a entrada do péptido na membrana, conservando um número ainda significativo de ligações quando inserido nas posições mais interiores da membrana, o que indica como em casos anteriores o efeito da entrada de água no GA para hidratar o péptido. Há um aumento das ligações internas de hidrogénio com a inserção do péptido no interior da membrana, aumentando gradualmente à medida que vai ocupando o grupo apolar da membrana, esta situação, tal como descrito nas situações anteriores pode ter um efeito que suaviza a penalização entálpica associada à dessolvatação do péptido. Para valores de $d_{CM} < 2.5$ nm parece haver uma estabilização da hidratação do péptido, tal como se observou para Fba1. No entanto o perfil de PMF é bastante distinto, sendo que por si só a análise das ligações de hidrogénio permite estabelecer uma relação direta com o perfil de PMF. Em todas as janelas de simulação há interação do péptido

com o GP da membrana, as ligações de hidrogénio com o GP atinge um valor máximo para $d_{CM} \approx 2.5$ nm (Figura 31 B), verificando-se nesta zona a maior interação do péptido com o GP da membrana (ilustrado na Figura 22 B). Tal como acontece com o péptido Fba, verifica-se alguma adesão do péptido N-terminal à superfície da membrana quando este se encontra na interface GP/S, o que se traduz no maior número de ligações de hidrogénio com o GP observado nesta zona.

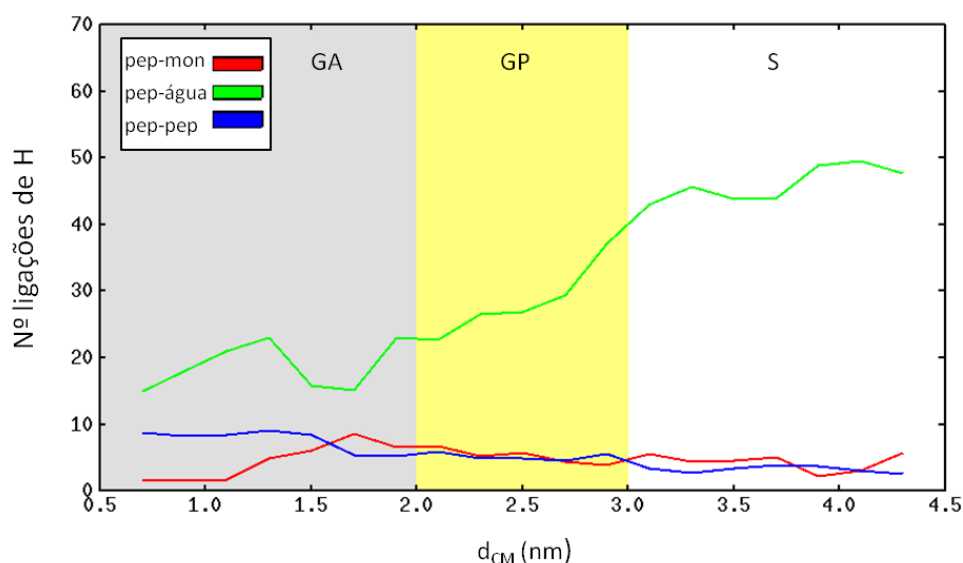


Figura 32 - Numero de ligações de hidrogénio estabelecidas para o sistema com o péptido Pkg1 em função da distância entre o centro de massa da membrana e do péptido (d_{CM}) ao longo da coordenada de reação z . Foi calculada a média das ligações para intervalos de 0.2 nm. Estão representadas as ligações entre o péptido e a membrana (vermelho), as ligações entre o péptido e água (verde) e as ligações internas do péptido (azul). Estão marcadas áreas correspondentes aos diferentes ambientes encontrados no sistema: o meio aquoso, populado por apenas moléculas de água (S), o grupo polar dos lípidos que formam a membrana (GP) e a parte do sistema onde predomina o grupo apolar da membrana (GA).

Na Figura 32 está representado o valor médio das ligações estabelecidas para intervalos de 0.2 nm da distância entre os centros de massa do péptido Pkg1 e a membrana de monooleína. A inserção do péptido em membrana é acompanhada de uma diminuição da hidratação do péptido. O número de ligações intramoleculares do péptido aumenta com a entrada do péptido na membrana, verificando-se um aumento no número de ligações até o péptido se encontrar inserido em posições mais interiores do GA da membrana. O número de ligações de hidrogénio estabelecidas com o GP da membrana regista um máximo a $d_{CM} \approx 1.7$ nm. Este máximo encontrado, coincide com o mínimo de energia observado no perfil de PMF obtido (Figura 27). A inserção do

péptido para posições inferiores a $d_{CM} \approx 1.7$ nm é acompanhada de uma diminuição das ligações de hidrogénio estabelecidas entre o péptido e a membrana, devido ao afastamento do péptido do GP. Ao mesmo tempo verifica-se um aumento das ligações intramoleculares do péptido e um aumento das ligações de hidrogénio com as moléculas de água. Esta situação ilustra a entrada progressiva de resíduos polares, ou com carga, que anteriormente estavam inseridos no GP, para o GA e a consequente entrada de moléculas de água no interior do GA. Tal como descrito anteriormente, a entrada de resíduos polares ou com carga é acompanhada da entrada de moléculas de água que hidratam o péptido. Encontra-se uma diminuição no número de ligações com moléculas de água entre $d_{CM} \approx 1.8$ e 1.4 nm (Figura 32), este facto pode estar associado à internalização de moléculas de água. Esta internalização não é tão acentuada neste intervalo, pelo facto de haver uma grande interação do péptido com o GP da membrana, à medida que o péptido se insere no GA, as interações com o GP não são favorecidas, traduzindo-se na inserção de moléculas de água no GA.

3.1.3. Análise conformacional

Foram estudadas as alterações na conformação dos péptidos através da análise dos desvios da estrutura em relação a estruturas de referência. Como referência foram utilizadas as estruturas dos péptidos criadas a partir da informação obtida experimentalmente por cristalografia de raios X. A comparação foi feita com a sobreposição dos C α das conformações obtidas em cada *frame* de simulação e a respetiva estrutura de referência, calculando-se o RMSD (*root mean square deviation*). Desta forma é possível acompanhar as mudanças de conformação que o péptido sofre ao longo da sua transição de água para a membrana.

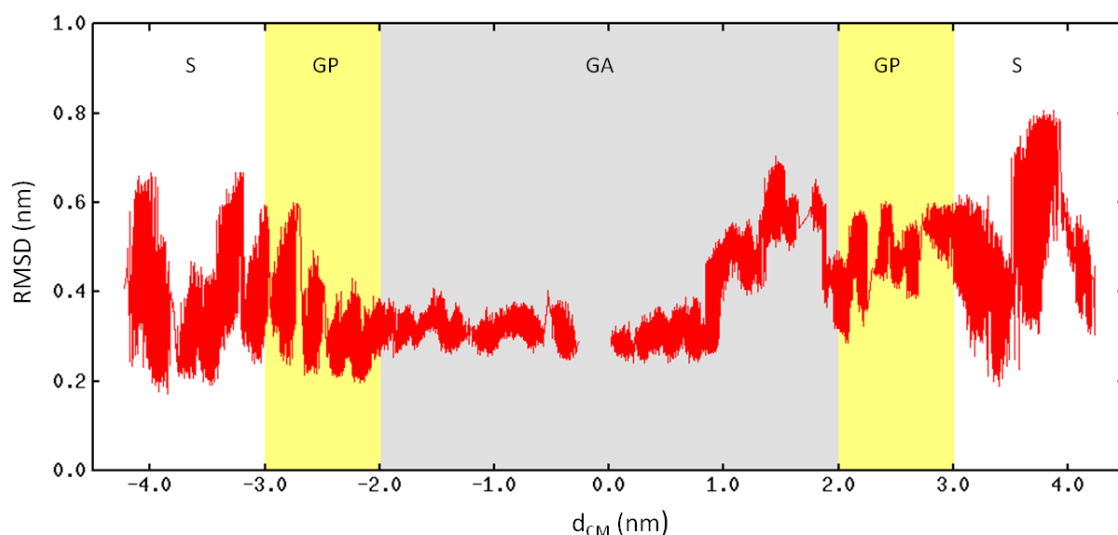


Figura 33 - RMSD dos C α do péptido Enol em função da distância entre o centro de massa da membrana e do péptido (d_{CM}) ao longo da coordenada de reação z . Estão marcadas áreas correspondentes aos diferentes ambientes encontrados no sistema: o meio aquoso, populado por apenas moléculas de água (S), o grupo polar dos lípidos que formam a membrana (GP) e a parte do sistema onde predomina o grupo apolar da membrana (GA).

Na Figura 33 estão representados os desvios da estrutura em relação aos C α do péptido Enol ao longo da coordenada de reação. A deslocação do péptido pela monocamada inferior corresponde à parte negativa do eixo da coordenada de reação z , a deslocação pela monocamada superior está representada na parte positiva. De uma forma geral a exposição do péptido ao solvente aquoso é acompanhada de um aumento o RMSD, verificando-se também maiores flutuações da estrutura. Prestando

uma maior atenção ao comportamento do péptido na monocamada superior verifica-se a $d_{CM} \approx 1$ nm uma mudança abrupta da conformação do péptido visível através de um aumento acentuado nos valores de RMSD verificando-se uma diminuição a partir de $d_{CM} \approx 2$. Esta mudança coincide com a entrada do C-terminal para posições mais interiores no meio hidrofóbico. A inserção do C-Terminal no GA expõe os resíduos 13-Thr, 14-Thr (polares) e 11-Asp⁻, assim como também o grupo carboxilo do C-terminal a um meio hidrofóbico sendo compensada e pelo arrastamento de moléculas de água para o interior da membrana (tal como e ilustrado na Figura 20). No entanto ao inserir-se cada vez mais no núcleo hidrofóbico verifica-se a mudança de conformação a $d_{CM} \approx 1$ nm que parece proteger preferencialmente o resíduo 11-Asp⁻. Durante o resto da migração, até atingir a interface GA/GP da monocamada superior, a mudança de conformação do C-Terminal observada a $d_{CM} \approx 1$ nm mantém-se, sendo preservadas moléculas na vizinhança, parcialmente protegidas das cadeias alifáticas do GA pelo C-terminal (ver Figura 20 D e E).

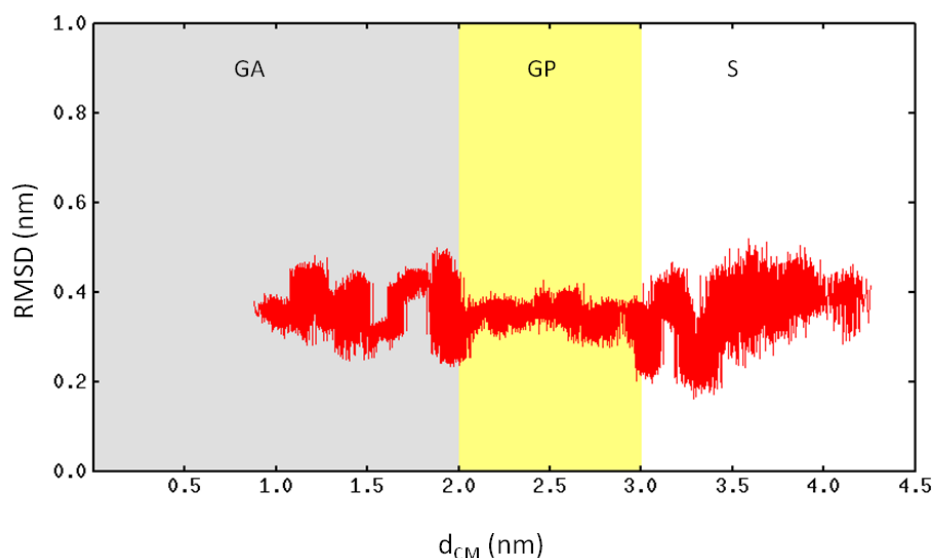


Figura 34 - RMSD dos C α do péptido Fba em função da distância entre o centro de massa da membrana e do péptido (d_{CM}) ao longo da coordenada de reação z. Estão marcadas áreas correspondentes aos diferentes ambientes encontrados no sistema: o meio aquoso, populado por apenas moléculas de água (S), o grupo polar dos lípidos que formam a membrana (GP) e a parte do sistema onde predomina o grupo apolar da membrana (GA).

Na Figura 34 estão representados os desvios da estrutura em relação aos C α do péptido Fba ao longo da coordenada de reação. A estrutura do péptido sofre maiores desvios quando o péptido se encontra inserido no GA e em água, verificando-se

também maiores flutuações. Para valores de d_{CM} compreendidos entre 2 e 3 nm, verificam-se menores flutuações à estrutura do péptido, o que sugere que há uma restrição maior aos movimentos do péptido quando ele se encontra distribuído pelo GP e interfaces GA/GP e GA/S, ao contrário do que acontece com o péptido Enol na mesma zona. Como foi ilustrado na Figura 21 B, o N-Terminal adota uma orientação paralela à superfície da membrana, adicionalmente, também se verifica o maior número de ligações estabelecidas entre o péptido e o GP. Todas estas informações sugerem que o péptido tem uma grande interação com GP da membrana, restringindo os graus de liberdade péptido pela adesão à sua superfície, o que se traduz na menor flutuação verificada nessa zona. Quando inserido no GA o péptido rodeia-se de moléculas de água que hidratam os grupos polares e as cargas das cadeias laterais do péptido. Por outro lado estes grupos tendem ficar juntos pelo que o péptido adota conformações que aproximam esses grupos o que se traduz nos desvios observados. Quando em água, as flutuações da estrutura não são tão acentuados como se verifica para o péptido Enol, como se observa na Figura 21 C, o péptido em água adota um motivo em α -hélice, o que pode justificar a menor flutuação observada em relação ao péptido Enol.

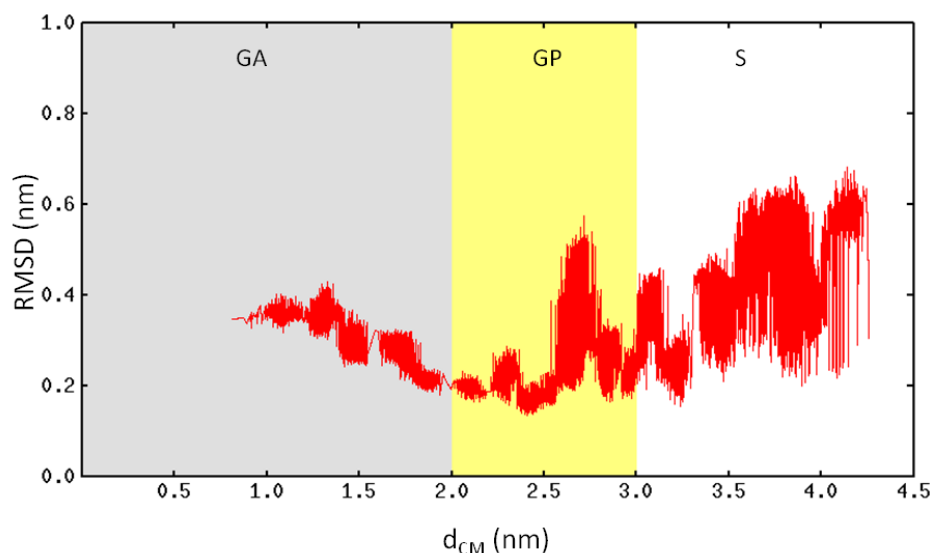


Figura 35 - RMSD dos C α do péptido Met6 em função da distância entre o centro de massa da membrana e do péptido (d_{CM}) ao longo da coordenada de reação z . Estão marcadas áreas correspondentes aos diferentes ambientes encontrados no sistema: o meio aquoso, populado por apenas moléculas de água (S), o grupo polar dos lípidos que formam a membrana (GP) e a parte do sistema onde predomina o grupo apolar da membrana (GA).

Na Figura 35 estão representados os desvios da estrutura em relação aos C α do péptido Met6 ao longo da coordenada de reação. Em água C-terminal adota conformação em α -hélice (ver Figura 22 C), e o N-terminal mantém conformação em *random coil*. Verifica-se um aumento do valor de RMSD da estrutura com a saída do péptido para o meio aquoso onde se observa também maior flutuação da estrutura do péptido. Provavelmente estes desvios encontrados são devidos, principalmente, às variações de conformação do N-terminal devido à sua estrutura em *random coil*. No interior da membrana, a entrada do péptido para o domínio apolar é acompanhada de um aumento dos desvios à estrutura, não se verificando no entanto grandes flutuações, o que sugere uma mudança de conformação do péptido. Esta mudança permite ao péptido a aproximação dos grupos polares e cargas existente nas cadeias laterais, favorecendo as interações entre eles. Esta situação torna-se vantajosa quando estes grupos se encontram num meio desfavorável como é o GA (esta situação encontra-se ilustrada na Figura 22 A). Entre $d_{CM} \approx 2$ e $d_{CM} \approx 4$ nm verifica-se uma estabilização da estrutura, observando-se poucas flutuações na estrutura do péptido. Nesta zona, há uma grande interação do péptido com o GP, na análise das ligações de hidrogénio verifica-se um máximo no número de ligações do péptido ao GP, na Figura 22 B observa-se que o N-terminal adota uma orientação que favorece a interação com a membrana.

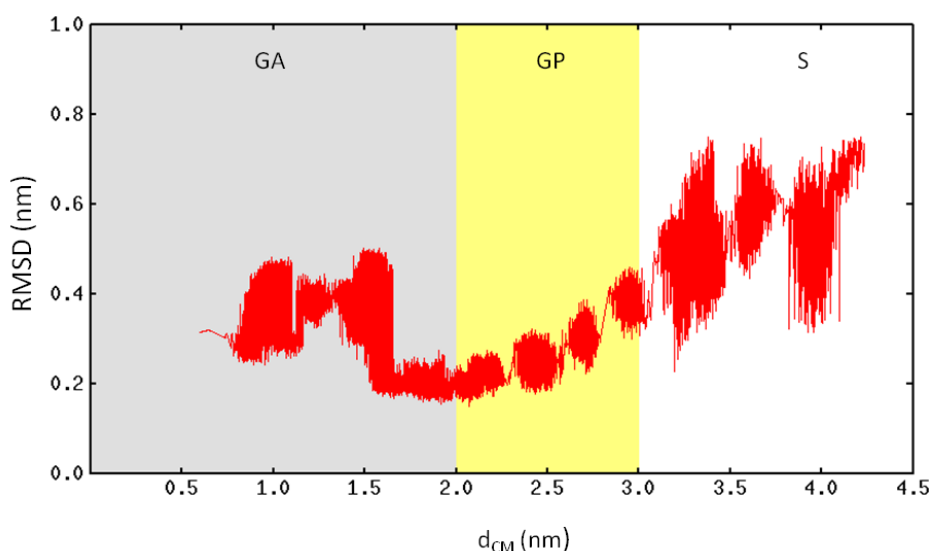


Figura 36 - RMSD dos C α do péptido Pgk1 em função da distância entre o centro de massa da membrana e do péptido (d_{CM}) ao longo da coordenada de reação z . Estão marcadas áreas correspondentes aos diferentes ambientes encontrados no sistema: o meio aquoso, populado por apenas moléculas de água (S), o grupo polar dos lípidos que formam a membrana (GP) e a parte do sistema onde predomina o grupo apolar da membrana (GA).

Na Figura 36 estão representados os desvios da estrutura em relação aos C α do péptido Pgk1 ao longo da coordenada de reação. Verifica-se a restrição do péptido quando inserido no GP verificando-se uma menor flutuação da estrutura nessa zona. Apenas com um maior afastamento da membrana é que se verificam aumentos no desvio e flutuação da estrutura, o que sugere que na proximidade da superfície da membrana há adesão à superfície que resulta na restrição da mobilidade do péptido. O péptido mostra uma mudança de conformação abrupta a $d_{CM} \approx 1.6$ nm quando é internalizado no GA, observando-se maiores flutuações à estrutura na parte mais interna da membrana. Esta mudança de conformação pode ser associada à internalização de moléculas de água para o GA que hidratam o péptido, assim como foi observado na análise das ligações de hidrogénio, o que se traduz numa reorganização rápida do péptido. Para $d_{CM} < 1.6$ nm há uma mudança abrupta na conformação do péptido. As simulações de *umbrella sampling*, aplicam um potencial que restringe o péptido a uma determinada coordenada do sistema. Neste caso o péptido é restringido no interior do GA, que tal como foi observado pelo perfil de PMF é para $d_{CM} < 1.7$ nm a inserção do péptido Pgk1 é energeticamente desfavorável. Esta mudança de conformação pode estar associada à internalização do C-terminal no GA,

o que sugere que há uma forte adesão ao GP da membrana. Neste caso atinge-se uma situação limite que resulta numa inserção abrupta do C-terminal no GA o que resulta numa reorganização do péptido que dá origem aos desvios observados.

3.2. Simulações de Dinâmica molecular

Foram feitas várias simulações de Dinâmica Molecular para estudar a interação dos péptidos com superfície da membrana. Ao contrário das simulações de PMF usando o método de amostragem *umbrella sampling*, estas simulações são feitas em sistemas nos quais não são aplicados potenciais de restrição. No entanto, nos tempos utilizados neste tipo de simulações, na ordem da centena de nanossegundos, pode não ser possível observar diretamente a partição dos péptidos em membrana (Ulmschneider *et al.* 2011). Para tal foram feitas simulações com os péptidos em diferentes meios: em água, à superfície da membrana e no interior da membrana, permitindo uma amostragem conformacional do sistema em equilíbrio sem qualquer *bias* potencial.

Na Figura 37, estão representadas as últimas *frames* das simulações feitas com os sistemas contendo o péptido Enol, correspondentes a 100 ns de simulação. Este péptido não adquire, em nenhum dos meios, uma estrutura secundária, adotando sempre conformações em *random coil*. À superfície da membrana, o péptido Enol distribui-se longitudinalmente pela superfície da membrana, o que lhe permite um maior estabelecimento de ligações de hidrogénio com a superfície da membrana. Quando inserido no interior da membrana, verifica-se a entrada de moléculas de água para o interior hidrofóbico da membrana. Este efeito hidrata tanto as cadeias laterais dos resíduos polares ou com carga, e as ligações peptídicas do *backbone*. Este efeito parece mais pronunciado no C-Terminal do que no N-terminal. Ao longo da simulação é conservado N-terminal *turn*, que permite o estabelecimento de interações intramoleculares. Neste terminal, verifica-se o estabelecimento de ligações, que se preservam ao longo de toda a simulação, entre o 9-Glu⁻ e o grupo amina do N-terminal, entre 3-Arg⁺ e 1-Asp⁻, que podem corresponder a ligações iónicas, que são estáveis em meio hidrofóbico (Marcela *et al.* 2003). Junto à interface, verifica-se uma pequena perturbação da membrana lipídica junto do péptido. Esta situação é vantajosa porque pode facilitar a entrada de moléculas de água para o interior da membrana Freitas *et al.* (2005). O C-terminal tem os resíduos polares, ou com carga e o *backbone* expostos ao meio hidrofóbico da membrana, pelo que resulta na inserção

de moléculas de água para o interior da membrana. Também se verificam algumas interações intramoleculares com é o caso das cadeias laterais dos resíduos, 11-Asp⁻, 13-Thr, 14-Thr que interagem entre si, e possivelmente com o backbone, que permite estabelecer ligações de hidrogénio, preservando alguma da hidratação.

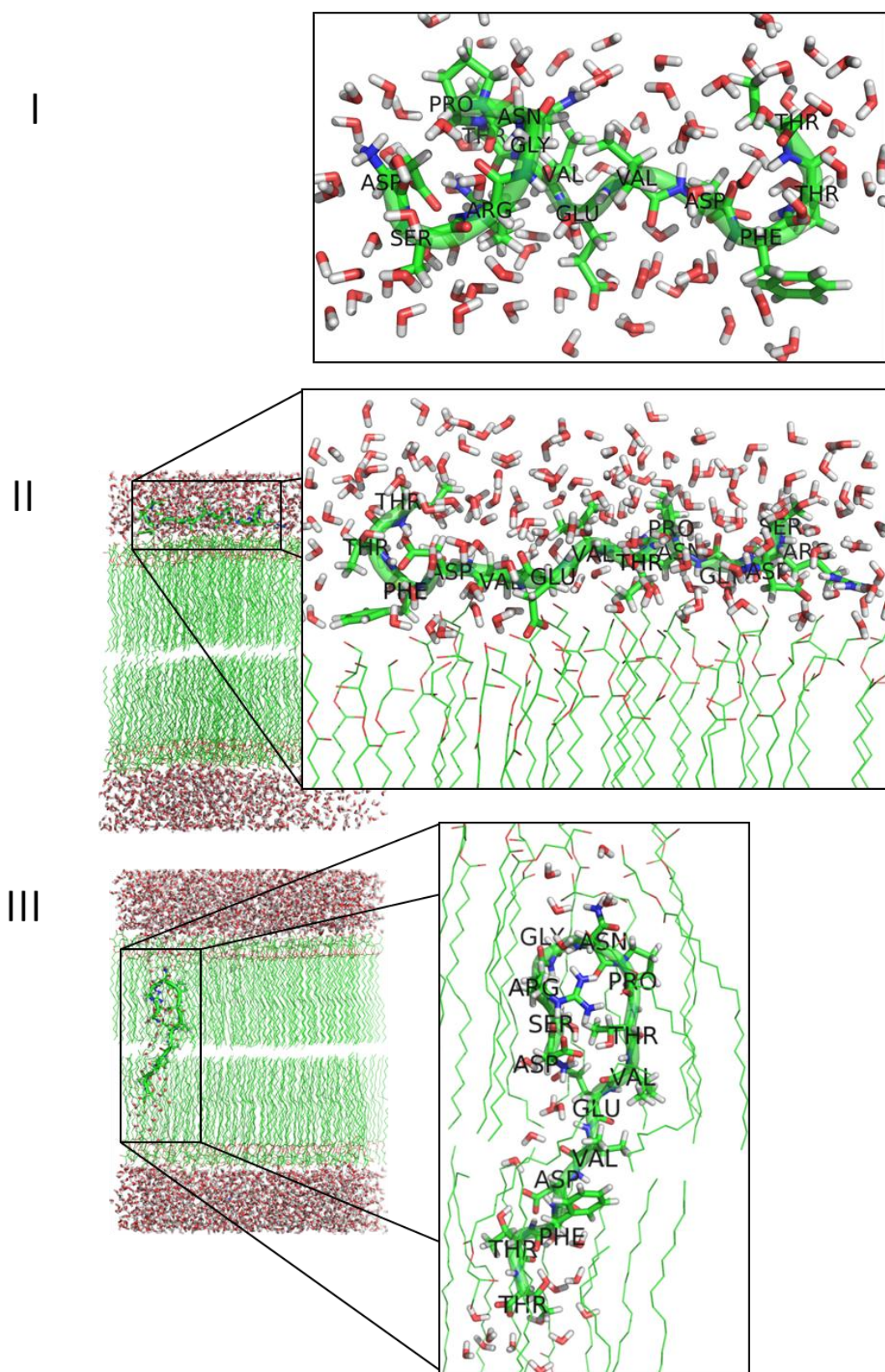


Figura 37- Representação do sistema contendo o péptido Enol na membrana de monooleína. Estão representados as frames dos sistemas: I) péptido em água II) péptido à superfície da membrana; III) péptido inserido na membrana após 100 ns de simulação.

Na Figura 38 estão representadas as últimas *frames* das simulações feitas para os sistemas contendo o péptido Fba, correspondentes ao instante de tempo de 100 ns de simulação. Este péptido apresenta um motivo em α -hélice em todos os meios. À superfície da membrana, o péptido assume uma orientação paralela à superfície, que permite o estabelecimento de ligações de hidrogénio entre o péptido e a membrana. Quando inserido no interior, o péptido localiza-se junto ao GP da membrana. Verifica-se uma pequena deformação da membrana, localizada na vizinhança do péptido, o que permite a interação entre o GP da membrana e o péptido. Nessa deformação, verifica-se a entrada de moléculas de água. Este conjunto formado vai permitir a hidratação do péptido, o que diminui a penalização energética associada à dessolvatação do péptido. Verificam-se algumas interações que permanecem ao longo da simulação, entre os resíduos 3-Lys⁺, 6-Lys⁺ do N-terminal e os resíduos 10-Asp⁻ e 14-Glu⁻ do C-terminal, que podem corresponder a ligações iónicas. No N-terminal também se verifica uma possível ligação iónica entre a cadeia lateral do 4-Asp⁻ e o grupo amina do N-terminal. Na porção do péptido inserida em posições mais interiores do GP, encontram-se alguns resíduos apolares, com é o caso da Ile, Phe, Val, Ala.

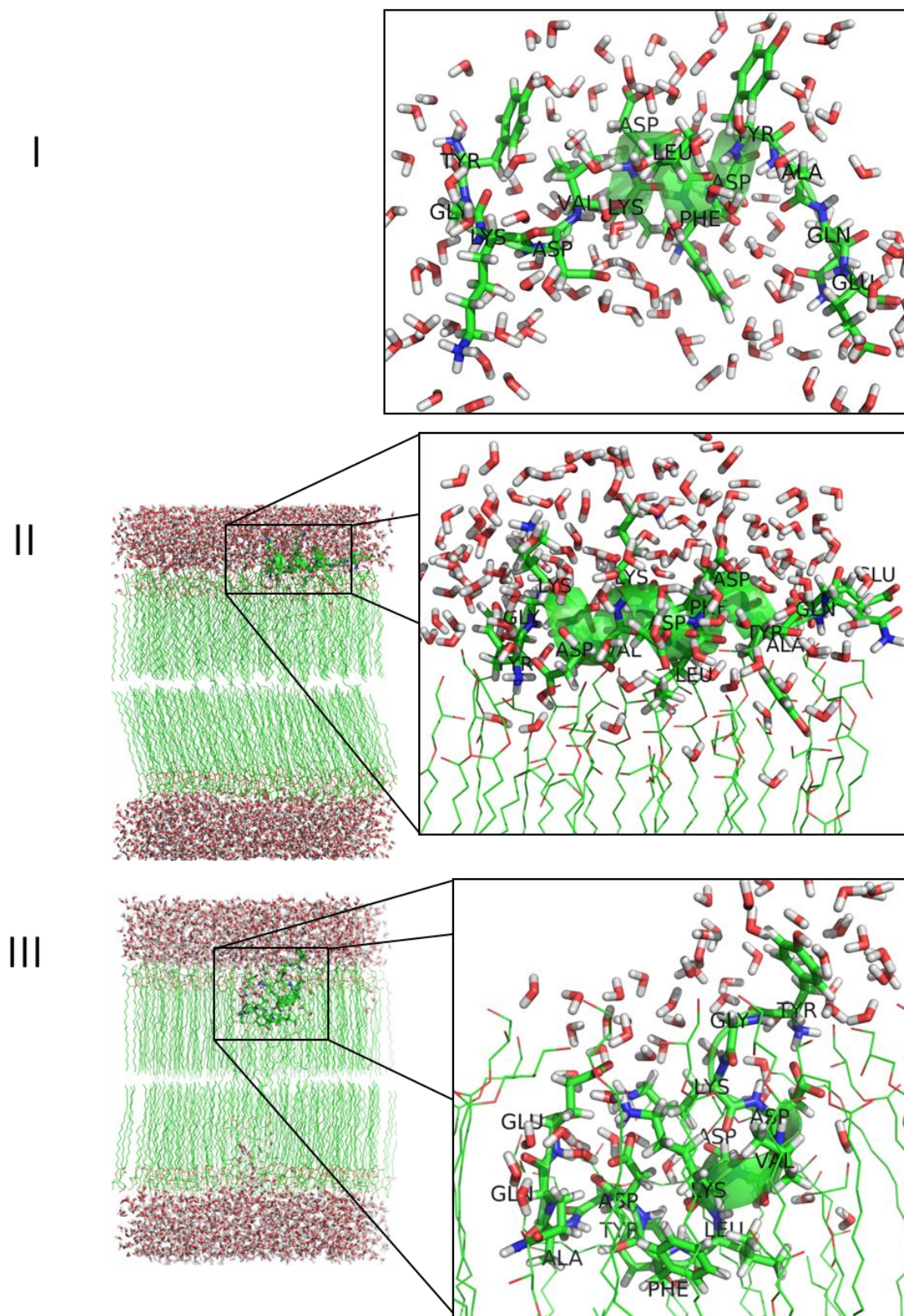


Figura 38 - Representação do sistema contendo o péptido Fba na membrana de monooleína. Estão representados as frames dos sistemas: I) péptido em água II) péptido à superfície da membrana; III) péptido inserido na membrana após 100 ns de simulação.

Na Figura 39 estão representadas as últimas *frames* das simulações feitas para os sistemas contendo o péptido Met6, correspondentes ao instante de tempo de 100 ns de simulação. Nas diferentes simulações estudadas, este péptido apresenta um motivo em α -hélice, sempre formado pela sequência de resíduos 8-Glu⁻, 9-Leu, 10-Lys⁺, 11-Lys⁺. A Lys⁺ e Leu, são conhecidas como sendo bons formadores de α -hélice (Pace e Scholtz, 1998), daí tratar-se de uma secção do péptido que preserva este motivo. Quando o péptido se encontra na superfície da membrana, este adota conformações que aparentam aumentar a interação do péptido com a membrana, no caso ilustrado, verifica-se orientação paralela do N-terminal à superfície da membrana, o que parece favorecer o estabelecimento de ligações de hidrogénio entre GP de algumas cadeias laterais do péptido, assim como também com o *backbone* que se encontra exposto ao solvente, note-se por exemplo, os resíduos Gly que não apresentam cadeia secundária. Verificam-se também o estabelecimento de ligações internas entre o resíduo 2-Arg⁺ do N-terminal e o grupo carboxilo do C-terminal. No interior da membrana, verifica-se que o N-terminal se localiza na interface GP/S, ficando o C-terminal inserido no interior da membrana. A inserção do péptido parece criar uma pequena deformação na membrana, devido à reorientação do GP para favorecer a hidratação do péptido, além do GP da membrana, assim como também se verifica a inserção de moléculas de água para a vizinhança do péptido. A posição do N-terminal, favorece interações das cadeias laterais polares ou com carga, com o GP ou com moléculas de água. No caso do C-terminal, que se encontra no GA da membrana, são observados vários mecanismos que permitem a hidratação do péptido, tal como já foi referido, a inserção de moléculas de água e GP para a vizinhança do péptido, permite o estabelecimento de ligações de hidrogénio. Adicionalmente, também se verificam algumas interações intramoleculares que permitem ao péptido manter a hidratação. Os resíduos Lys⁺ conseguem facilmente orientar a sua cadeia lateral, para satisfazer interações específicas (Strandberg e Killian, 2003). Neste caso verifica-se, no C-terminal tanto a orientação da cadeia lateral da 11-Lys⁺ em direção do GP, como também a orientação da cadeia lateral de 10-Lys⁺ para estabelecer uma ligação intramolecular com o 14-Glu⁻. Também se verifica a interação entre a cadeia lateral da Thr com o *backbone* do péptido, o que se torna mais vantajoso do que inserir moléculas de água na sua vizinhança (Johansson e Lindahl, 2006).

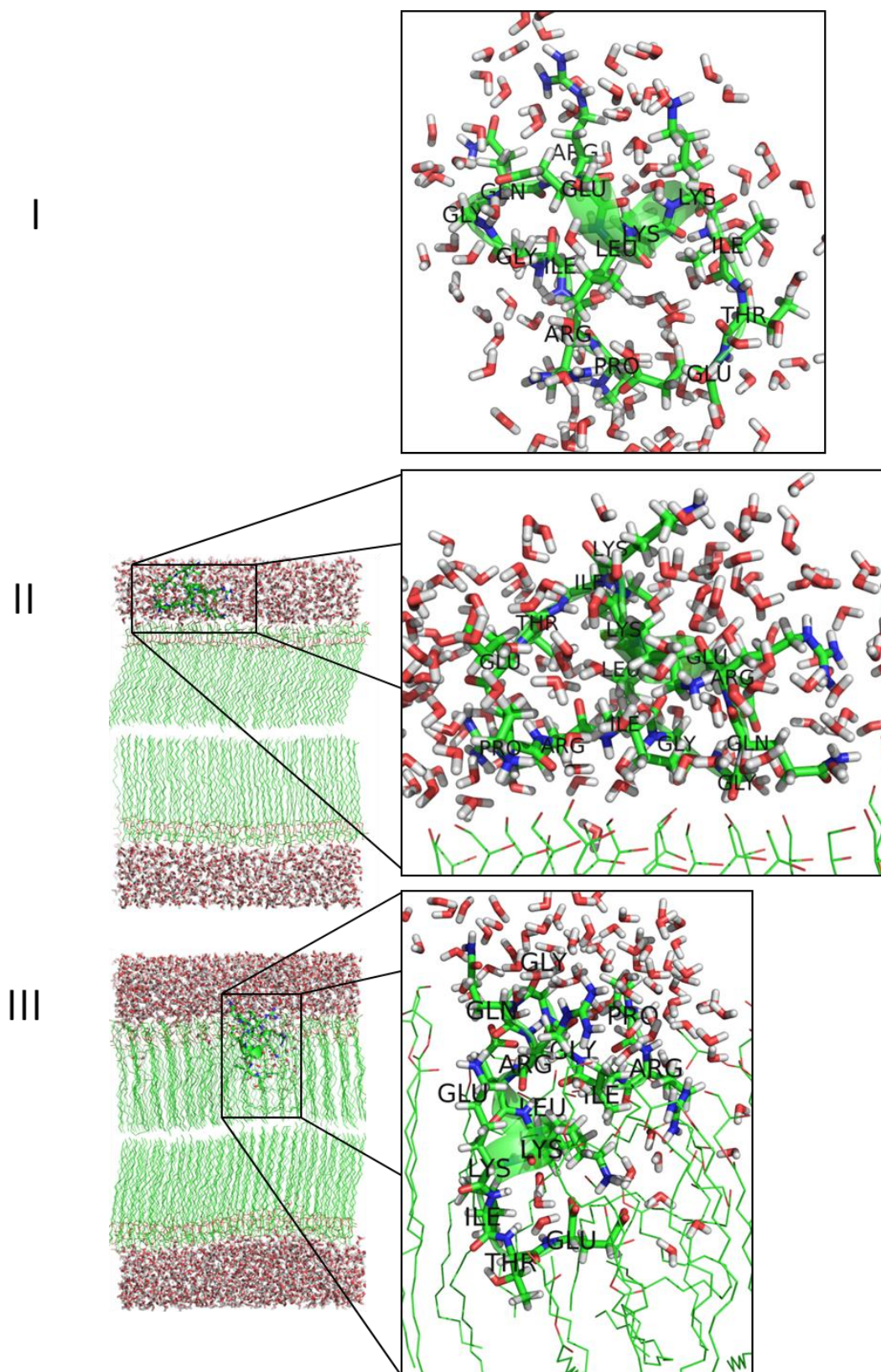


Figura 39 - Representação do sistema contendo o péptido Met6 na membrana de monooleína. Estão representados as frames dos sistemas: I) péptido em água II) péptido à superfície da membrana; III) péptido inserido na membrana após 100 ns de simulação.

As últimas *frames* das simulações feitas para os sistemas contendo o péptido Pgk1, encontram-se representadas na Figura 40. Quando inserido em água este péptido assume uma forma globular, que permite aproximar algumas cadeias laterais de resíduos apolares, como é o caso da 14-Ile, 1-Val e 2-Pro, por outro lado alguns dos resíduos polares, ou com carga parecem orientar-se na direção do solvente. Este tipo de conformação torna-se vantajoso num meio hidrofílico, como é o caso da água, permitindo proteger alguns resíduos. Também se verifica um motivo em α -hélice, que não é observado nos outros sistemas. O péptido Pgk1, quando se encontra junto à superfície da membrana, adota conformações que permite o estabelecimento de ligações internas do *backbone*, ao mesmo tempo que permite a interação do péptido com a superfície da membrana, adotando orientações paralelas à superfície. Quando inserido no interior da membrana, o péptido mantém o C-terminal na interface GP/S, ficando o N-terminal repartido entre o GP e o GA. Verifica-se uma pequena perturbação da membrana, na vizinhança do péptido que permite a orientação do GP para hidratar o péptido, acompanhado da entrada de algumas moléculas de água para o interior da membrana. Verifica-se a orientação das cadeias laterais de vários resíduos polares, ou com carga, como é o caso da 5-Lys⁺, 4-Asp⁻, 11-Asn, 12-Gln, 13-Arg⁺, em direção à superfície da membrana, esta migração permite reter a hidratação destes resíduos.

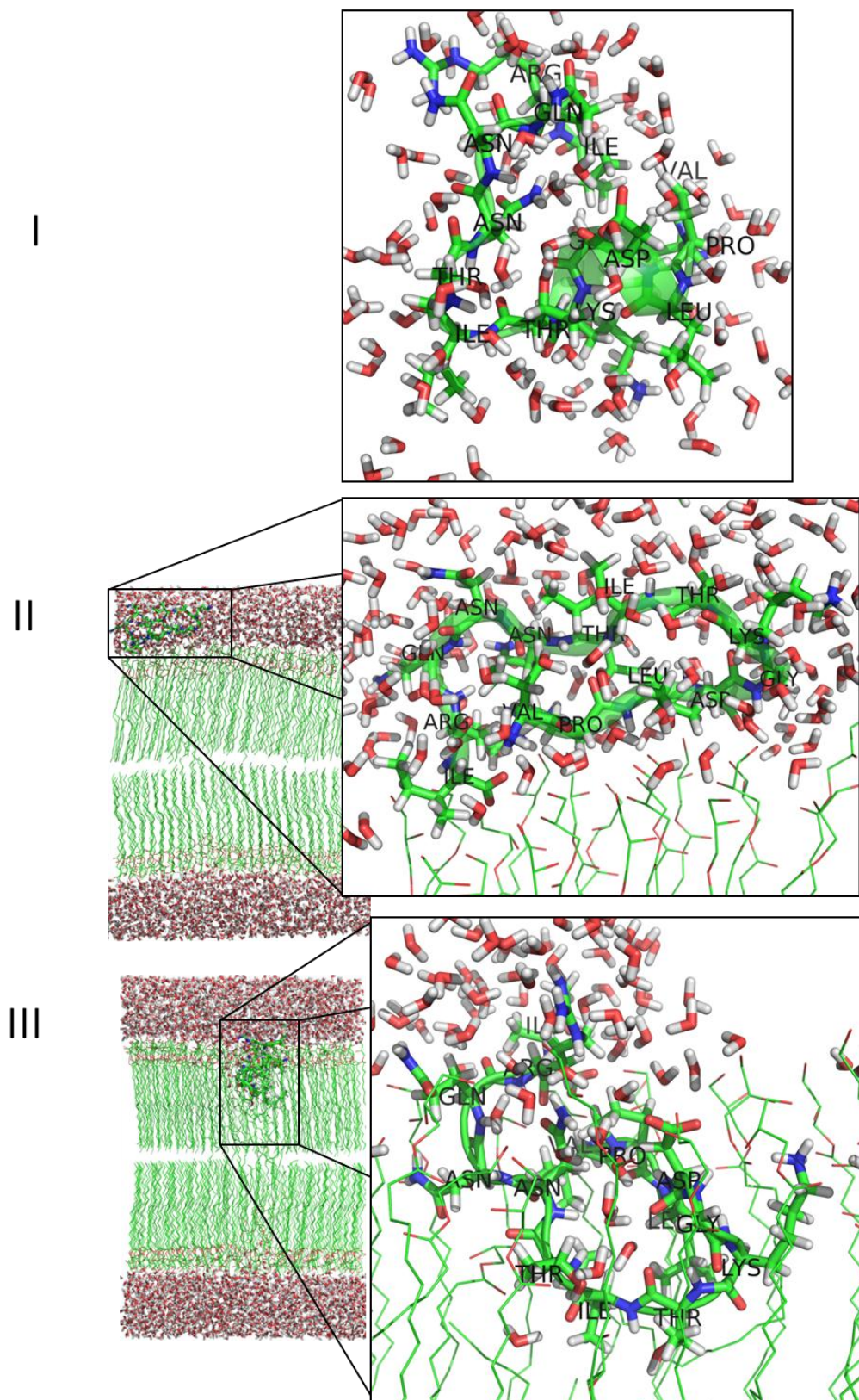


Figura 40 - Representação do sistema contendo o péptido Pgk1 na membrana de monooleína. Estão representados as frames dos sistemas: I) péptido em água II) péptido à superfície da membrana; III) péptido inserido na membrana após 100 ns de simulação.

3.2.1. Localização dos péptidos em membrana

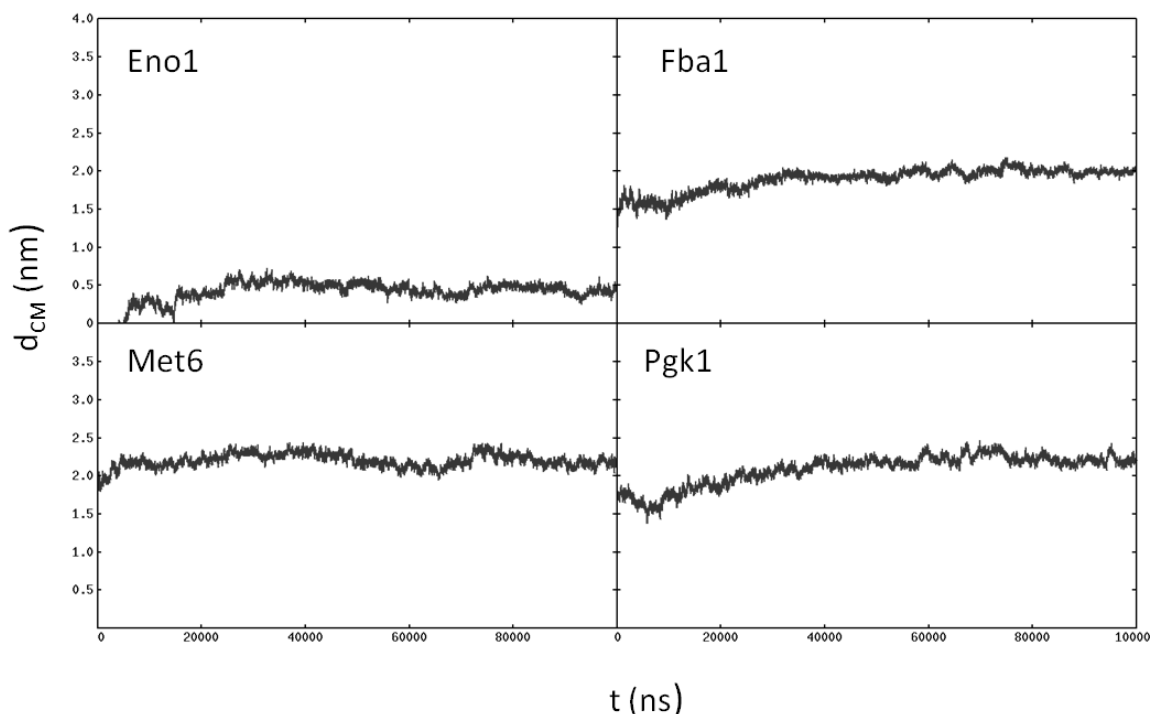


Figura 41 - Distância entre os centros de massa dos diferentes péptidos e a membrana para os sistemas contendo o péptido inserido no interior da membrana

Foi feita a análise da distância entre os centros de massa do péptido e da membrana, para os sistemas em que os péptidos se encontram inseridos no interior da membrana. Esta análise permite perceber qual a localização preferencial dos diferentes péptidos quando inseridos no interior da membrana. As distâncias entre os centros de massa entre péptido e membrana estão representados na Figura 41. Durante os 100 ns de simulação o péptido Eno1 migra para posições da membrana a $d_{CM} \approx 0.4$ (nm) ao fim de 40 ns, onde estabiliza até ao final da simulação. Este resultado é consistente com o perfil de PMF obtido. A análise do PMF sugere que o péptido tem dificuldade em migrar pela monocamada superior, preferindo posições próximas do centro da membrana.

O péptido Fba1 migra, ao fim de aproximadamente 50 ns de simulação, para posições a $d_{CM} \approx 2$ (nm), onde permanece até ao fim da simulação. No perfil de PMF

obtido, encontra-se um patamar de energia entre $d_{CM} \approx 1.5$ e 2.4 (nm) que é consistente com a localização obtida.

O péptido Met6 apresenta uma flutuação nas posições em relação à membrana. As posições do péptido variam entre $d_{CM} \approx 2$ e 2.4 nm, que é uma variação da mesma ordem do que se observa para os outros péptidos, no entanto o perfil obtido sugere uma maior dificuldade em estabilizar a posição. O perfil de PMF deste péptido sugere que pode migrar facilmente na interface GA/GP da membrana, sem nenhuma barreira significativa, o que pode estar associado à maior flutuação na posição do péptido observada.

O péptido Pgc1 estabiliza a sua posição em relação à membrana a $d_{CM} \approx 2.2$ a partir dos 40 ns mantendo-se até ao final da simulação. O PMF obtido para este péptido sugere que a sua localização preferencial é na interface GA/GP, o que é consistente com a posição do péptido observada.

3.2.2. Ligações de Hidrogénio

Foi calculado o número médio de ligações de hidrogénio estabelecidas entre os diferentes péptidos e as moléculas de água, entre os péptidos e a membrana e as ligações de hidrogénio intramoleculares dos vários péptidos. Para avaliar a existência de ligações de hidrogénio usou-se o critério geométrico ilustrado na Figura 28. Considerou-se que existe uma ligação de hidrogénio entre átomos dadores e aceptadores para as seguintes condições: $r \leq 0,35$ nm e $\alpha \leq 30^\circ$. Na Figura 42, estão representados os valores médios obtidos para as várias simulações feitas.

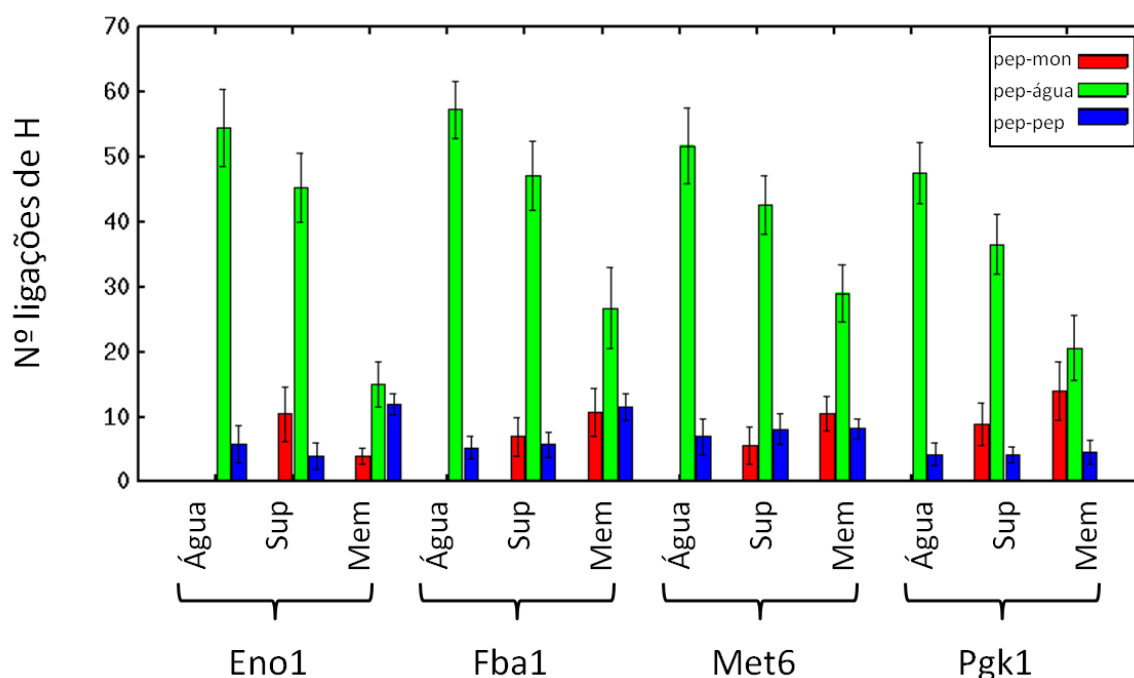


Figura 42 - Número médio (e o respetivo desvio padrão) de ligações hidrogénio estabelecidas para os vários sistemas utilizados, péptido em água (Água), à superfície (Sup) e inserido (Mem) em membrana. Para os diferentes sistemas foram avaliadas as ligações péptido-membrana (pep-mon), péptido-água (pep-água) e péptido-péptido (pep-pep)

A inserção do péptido Enol é acompanhada da perda de hidratação. Em água o péptido estabelece um número elevado de ligações com moléculas de água, verificando-se também o estabelecimento de ligações intramoleculares. Quando inserido à superfície da membrana, o estabelecimento de ligações com a membrana é acompanhado da diminuição do número de ligações com a água, continuando a ser a

maior contribuição para a hidratação do péptido, e também da diminuição das ligações intramoleculares, o que sugere que as conformações adotadas, favorecem o estabelecimento de ligações com a membrana. Entre estes dois sistemas, não parece haver diminuição da hidratação. Quando inserido no interior da membrana, o número de ligações com as moléculas de água cai drasticamente, assim como também se verifica a diminuição das ligações com o GP da membrana, devido à posição que o péptido ocupa na membrana. Por outro lado há um aumento do número de ligações internas, consistente com as observações feitas para a Figura 37, em que o péptido mantém estáveis conformações que permitem interações intramoleculares.

O péptido Fba quando inserido em água, ou à superfície da membrana, parece manter o número de ligações internas, havendo uma diminuição das ligações estabelecidas com água quando se encontra à superfície da membrana. Tal como se observou para Enol, entre os dois sistemas, não parece haver diminuição da hidratação. Quando inserido no interior da membrana, por se encontrar localizado preferencialmente junto do GP mantém um maior número de ligações com a membrana, do que se verificava à superfície. Adicionalmente também se verifica um aumento das ligações intramoleculares. A perda de ligações com moléculas de água não é tão acentuada como se verificou para Enol.

A inserção do péptido Met6 em membrana é acompanhada da perda de ligações com moléculas de água, sendo compensada pelo estabelecimento de ligações com o GP da membrana. O número de ligações intramoleculares é aproximadamente constante. A interação com a membrana, parece ser menos favorecida em relação às outras interações possíveis, mesmo quando inserido no interior da membrana junto ao GP, o número de interações com a membrana, não é tão acentuado como se verifica no caso do Fba, sendo as interações com as moléculas de água o principal fator de hidratação do péptido.

A inserção do péptido Pgk1 em membrana, não parece afetar o número de ligações intramoleculares, mantendo-se aproximadamente constante nos três meios estudados. A aproximação e inserção na membrana é acompanhada da perda de ligações com moléculas de água, estabelecendo-se ligações com a membrana, sendo o maior número de ligações estabelecido quando o péptido se encontra inserido na membrana, que tal como já foi referido, localiza-se junto ao GP. Quando inserido na

membrana, o estabelecimento de ligações com a membrana tem um papel bastante significativo, quando comparado com os péptidos referidos anteriormente, por outro lado no número de ligações intramoleculares aparenta ter um papel menos relevante na hidratação do péptido.

3.2.3. Superfície Acessível ao Solvente

O estudo da superfície acessível ao solvente (SAS), pode dar informações estruturais dos péptidos, avaliando a superfície dos péptidos que se encontra acessível ao meio onde estão inseridos. Desta forma é possível ilustrar de que forma as conformações adotadas pelos péptidos afetam a disponibilidade dos vários resíduos ao solvente. Na Figura 43, está representada o valor médio da percentagem de superfície hidrofóbica acessível ao solvente, para os diferentes péptidos, nos vários sistemas estudados. Uma análise mais detalhada é feita nas figuras Figura 44, Figura 45, Figura 46, Figura 47, em que é analisada a SAS para cada resíduo dos diferentes péptidos.

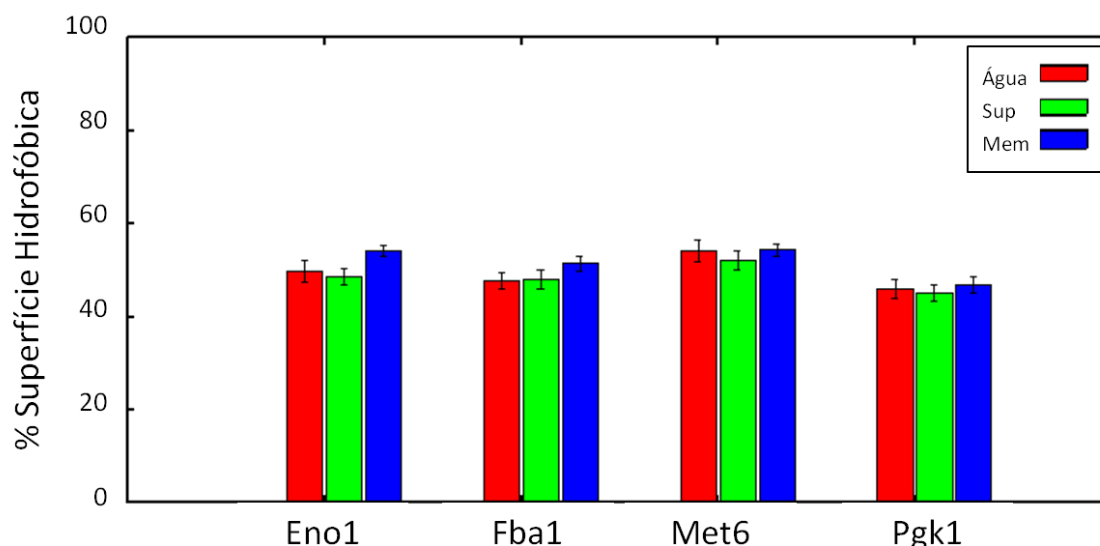


Figura 43 - Valor médio e respetivo desvio padrão da percentagem de superfície hidrofóbica acessível ao solvente para os diversos péptidos nos três sistemas estudados: péptido em água (Água), péptido à superfície da membrana (sup) e péptido inserido no interior da membrana (Mem)

A análise da percentagem de superfície hidrofóbica acessível ao solvente (Figura 43) revela que as propriedades anfífilas dos diferentes péptidos não variam significativamente. Os péptidos Enol e Fba apresentam um ligeiro aumento da razão entre a superfície hidrofóbica e hidrofílica quando inseridos no interior da membrana, já os péptidos Met6 e Pgc1 não apresentam uma variação tão significativa. Comparativamente, o péptido Pgc1 é o que apresenta uma percentagem de superfície hidrofóbica mais pequena quando comparado com os restantes péptidos, sendo os

valores mais altos obtidos para os péptidos Enol quando inserido no interior da membrana e o péptido Met6 quando inserido em água ou no interior da membrana. No entanto estas diferenças não ultrapassam os 5% de percentagem de superfície hidrofóbica.

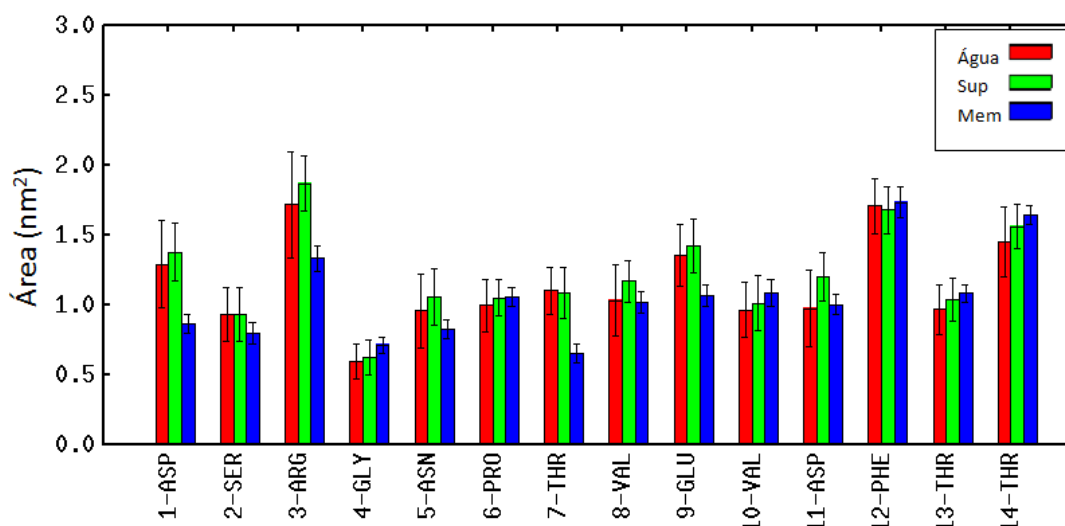


Figura 44 - Superfície Acessível ao Solvente média e respetivo desvio padrão de cada resíduo do péptido Enol para os sistemas contendo o péptido em água (Água), péptido à superfície da membrana (sup) e péptido inserido no interior da membrana (Mem)

A análise da SAS para cada resíduo, vai permitir perceber de que forma as conformações adotadas afetam a acessibilidade pelos diferentes péptidos se refletem na sua acomodação ao meio em que se encontram inseridos. O péptido Enol quando inserido no interior da membrana conserva um N-terminal *turn* ao longo de toda a simulação. Pela análise da SAS (Figura 44) é possível verificar que esta conformação permite ao péptido proteger alguns dos resíduos polares ou com carga do GA da membrana. Vários resíduos presentes no N-terminal *turn*, como o 1-Asp⁻, 2-Ser, 3-Arg⁺, 5-Asn, 7-Thr, 9-Glu⁻ apresentam uma área acessível ao solvente menor quando inseridos no interior da membrana. Esta observação vai de encontro à hipótese de que as cadeias laterais destes resíduos interagem entre si, o que por um lado permite o estabelecimento de algumas interações específicas e adicionalmente diminui o contacto destes resíduos com o domínio hidrofóbico da membrana, o que se traduz, de acordo com as observações feitas anteriormente, numa menor incorporação de moléculas de água para a vizinhança deste terminal. No caso do C-terminal, verifica-se

uma menor capacidade do péptido proteger as cadeias laterais polares, ou com carga quando inserido no interior da membrana. Esta observação é suportada pela análise da SAS, os resíduos de Thr do C-terminal apresentam no interior da membrana um aumento da SAS quando comparado com a inserção do péptido em água ou à superfície da membrana, assim como também a grande exposição observada para os resíduos apolares como é o caso do 12-Phe e 10-Val.

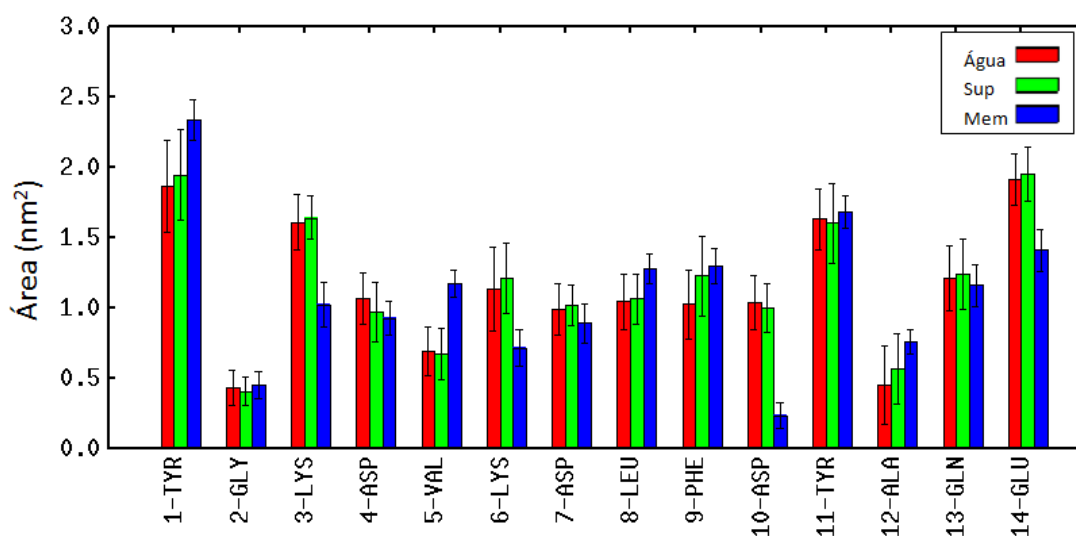


Figura 45 - Superfície Acessível ao Solvente média e respetivo desvio padrão de cada resíduo do péptido Fba para os sistemas contendo o péptido em água (Água), péptido à superfície da membrana (sup) e péptido inserido no interior da membrana (Mem)

O péptido Fba quando inserido no interior da membrana, localiza-se junto à interface, que é uma zona que apresenta um ambiente diversificado. A análise da SAS (Figura 45) revela que o péptido quando inserido no interior da membrana favorece interações entre as cadeias laterais dos resíduos polares ou com carga como é o caso dos resíduos 14-Glu⁻, 10-Asp⁻, 6-Lys⁺, 3-Lys⁺, que se traduz na diminuição da SAS quando comparado com a inserção deste péptido nos outros meios estudados. Por outro lado verifica-se o aumento da SAS dos resíduos apolares (Phe, Ala, Val) quando o péptido se encontra inserido no interior da membrana, pelo que as conformações adotadas favorecem a interação destes grupos com o GA da membrana. Desta forma verifica-se a adaptação do péptido à diversidade do meio encontrado na interface, por um lado há uma orientação das cadeias laterais dos resíduos polares ou com carga que

permitem a interação entre elas e a sua orientação na direção do GP da membrana, por outro lado, vários resíduos apolares aumentam a sua área de contacto com o GA da membrana.

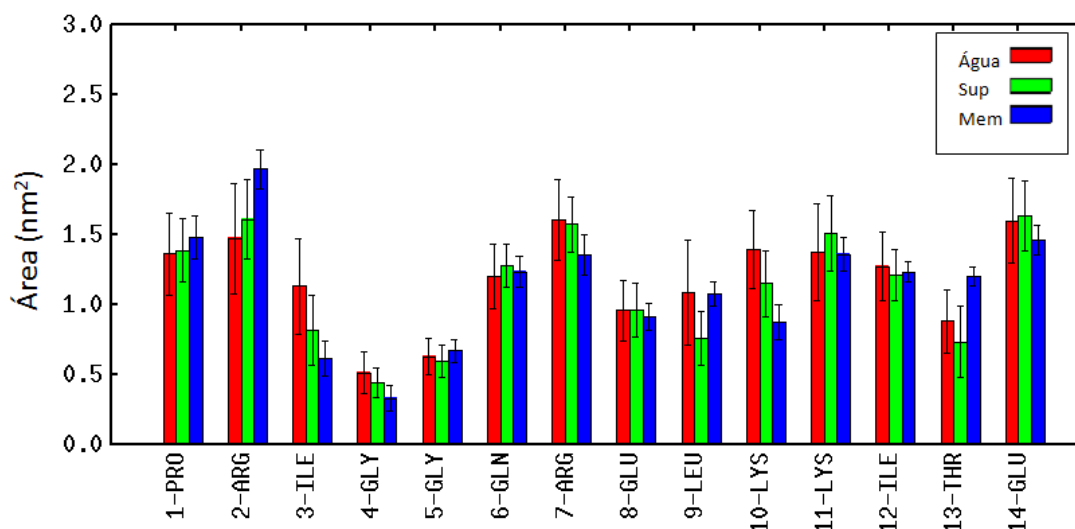


Figura 46 - Superfície Acessível ao Solvente média e respetivo desvio padrão de cada resíduo do péptido met6 para os sistemas contendo o péptido em água (Água), péptido à superfície da membrana (Sup) e péptido inserido no interior da membrana (Mem)

O péptido Met6 inserido na membrana localiza-se preferencialmente na interface da membrana. No sistema utilizado com o péptido inserido no interior da membrana, verificou-se que o péptido migra para a interface da membrana, ficando o N-terminal inserido á superfície da membrana e o C-terminal internalizado no GA. A análise da SAS encontra-se na Figura 46. Pelo fato do N-terminal se encontrar à superfície, quando o péptido se encontra inserido na membrana, verifica-se que vários resíduos polares não apresentam uma diminuição área acessível, verificando-se por vezes o oposto. Os resíduos 1-Pro e 6-Gln do N-terminal mantêm uma SAS com valores aproximados nos diferentes meios estudados, já que se encontram sempre um meio predominantemente polar. O resíduo 2-Arg⁺ do N-terminal apresenta um aumento da SAS na presença da membrana, apresentando a menor área quando inserida no sistema contendo apenas moléculas de água. A Arg⁺ é conhecida por ter facilidade em orientar facilmente a cadeia lateral para estabelecer interações favoráveis (Johansson e Lindahl 2006), pelo que o aumento observado da SAS pode refletir uma interação preferencial com o GP da membrana. Por outro lado o 7-Arg⁺ apresenta uma

diminuição da SAS, pelo que se deve possivelmente ao facto de estar localizada numa posição mais interna do péptido, pelo que a sua cadeia lateral será parcialmente ocultada pelo péptido. As conformações adotadas pelo péptido no interior da membrana permitem a diminuição da SAS do Ile, que por estar no N-terminal, está inserida num meio predominantemente polar. No C-terminal existem dois Lys⁺ seguidos, as quais apresentam diferentes comportamentos quando inseridas no interior da membrana. Tal como a Arg⁺ a Lys⁺ consegue facilmente orientar a sua cadeia lateral para estabelecer interações favoráveis (Strandberg e Killian, 2003), neste caso um destes resíduos orienta-se em direção ao GP da membrana, o que se traduz na pequena variação da SAS e o outro interage com o resíduo Glu⁻ (ver Figura 39), o que se traduz na diminuição da SAS observada.

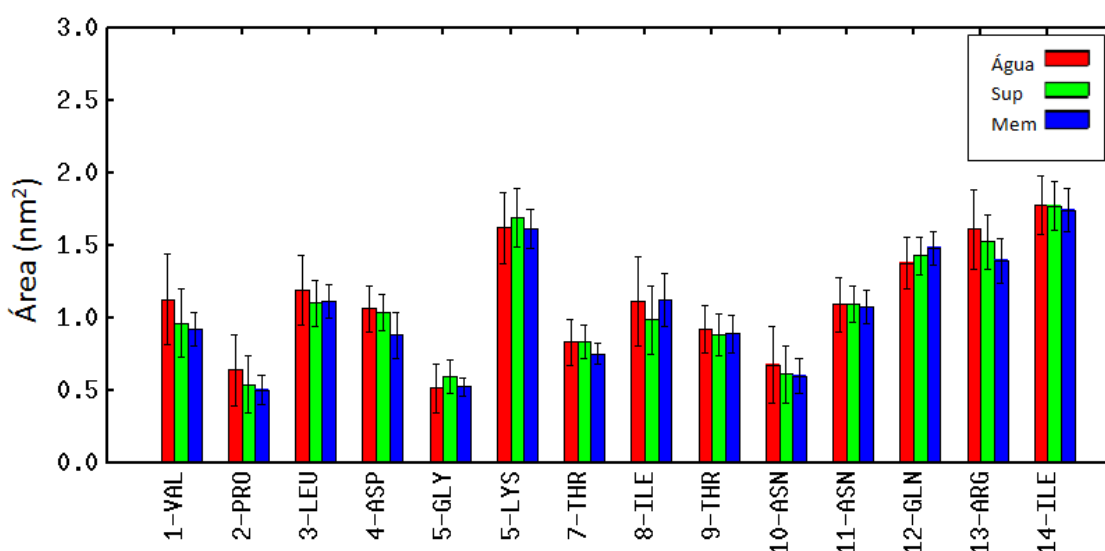


Figura 47 - Superfície Acessível ao Solvente de cada resíduo do péptido Pgc1 para os sistemas contendo o péptido em água, à superfície da membrana e inserido na membrana.

O péptido Pgc1 em todos os sistemas estudados, mantém sempre uma curvatura em todas as conformações adotadas, nos vários sistemas estudados, que permitem a interações intramoleculares, estas conformações vão sempre diminuir a superfície do péptido que se encontra acessível ao solvente. Daí, ao analisar a SAS para cada resíduo (Figura 47), de uma forma geral, não se registam grandes variações da SAS nos diferentes meios analisados, sendo as maiores variações observadas correspondentes aos resíduos posicionados nas extremidades do péptido. Quando em

contacto com a membrana, as extremidades dos terminais N e C aproximam-se, o que pode estar na origem da diminuição da SAS observada para os resíduos 1-Val, 2-Pro, 3-Leu e 4-Asp e 13-Arg quando comparados com a SAS em água, à exceção do 14-Ile, cuja cadeia lateral fica sempre exposta. Os resíduos localizados nas posições mais centrais adotam comportamentos mais heterogéneos, possivelmente porque algumas conformações ocultam parcialmente os resíduos, mas nem sempre favorece a localização das cadeias laterais dos resíduos, expondo-as a ambientes desfavoráveis. O resíduo 5-Lys apresenta pouca variação da SAS nos diferentes meios, como já foi referido anteriormente este resíduo orienta facilmente a sua cadeia lateral de forma a estabelecer interações favoráveis, quando inserida no interior da membrana, a cadeia lateral orienta-se na direção do GP da membrana.

4. Conclusão:

Foram obtidos os perfis de energia livre para quatro péptidos em membrana lipídica, usando o método de amostragem *umbrella sampling*. O perfil de PMF do péptido Enol sugere que a inserção do péptido em membrana é feita preferencialmente pelo N-terminal, o qual consegue migrar no interior da membrana até junto à interface GA/GP, ficando o C-terminal inserido totalmente no GA. A inserção em membrana é um processo que não é facilmente reversível apresentando uma barreira de energia que favorece localização do péptido no GA da membrana. O péptido Fba apresenta um perfil favorável à inserção na membrana, verificando-se um patamar de energia que sugere uma localização preferencial do péptido junto à interface GA/GP. A inserção deste péptido é favorável, no entanto, o processo oposto não é tão penalizado em termos energéticos como se verificou para o Enol. O péptido Met6, apresenta o perfil de PMF, com a variação de energia menos acentuada, de todos os péptidos estudados. Este perfil sugere, que a inserção do péptido em membrana é favorecida, no entanto é um processo facilmente reversível, não apresentando uma barreira de energia significativa que restrinja o péptido à membrana. Este péptido poderá ficar aderido à superfície da membrana, no entanto a ausência de uma barreira energética indica que este péptido poderá se libertar facilmente da membrana. Por último, o péptido Pkg1, apresenta um perfil de energia que favorece a internalização do péptido na membrana, até este se localizar na interface GA/GP apresentando um aumento de energia quanto se insere no GA. Este perfil sugere que este péptido fica restringido na interface GA/GP.

O uso de lipossomas como adjuvantes permite o encapsulamento tanto de moléculas hidrofílicas, as quais podem ser retidas no núcleo aquoso, como de moléculas hidrofóbicas, ficando embebidas na membrana lipossomal. O uso deste tipo de sistemas em estratégias imunoprotetoras tem como objetivo proteger e reter os antígenos no organismo hospedeiro o tempo suficiente para se obter uma resposta imunitária que induza memória.

O uso de uma membrana de monooleína neste estudo, permitiu obter informações acerca da interação dos diferentes péptidos com uma membrana neutra. Dos péptidos estudados, o que apresentou uma maior afinidade com a membrana foi o Enol, ficando retido no GA da membrana. Desta forma o péptido Enol apresenta-se como um dos candidatos preferenciais entre os péptidos estudados, para o

desenvolvimento de estratégias imunoprotetoras contra a *Candida albicans* prevenindo a sua libertação e consequente eliminação. Os péptidos Fba e Pgc1 mostraram localizar-se preferencialmente na interface GA/GP da membrana não apresentando no entanto uma afinidade tão grande como no caso do Enol. O péptido Met6 mostrou um perfil de energia que sugere que este se pode libertar facilmente da membrana. Assim sendo, para uso deste péptido para o desenvolvimento de vacinas contra *Candida albicans* a incorporação na membrana pode resultar numa libertação precoce, resultando na sua rápida eliminação do organismo. Como alternativa, será mais vantajoso encapsular o péptido Met6 no núcleo aquoso.

5. Bibliografia

Adams D. J. (1983) **Alternatives to the Periodic Cube in Computer Simulation.** *CCP5 Quarterly* 10:30-36.

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. (1990). **Basic Local Alignment Search Tool.** *J Mol Biol.* 215:403–410

Badiee A., Jaafari M. R., Khamesipour A., Samiei A., Soroush D., Kheiri M. T., Farzaneh Barkhordari, McMaster W. R., Mahboudi F., (2009a) **Enhancement of immune response and protection in BALB/c mice immunized with liposomal recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63): The role of bilayer composition.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 74:37–44

Badiee A., Jaafari M. R., Khamesipour A., Samiei A., Soroush D., Kheiri M. T., Barkhordari F., W. Robert McMaster, Mahboudi F. (2009b) **The role of liposome charge on immune response generated in BALB/c mice immunized with recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63).** *Experimental Parasitology* 121:362–369

Bayly C., Cieplak, P., Cornell, W., and Kollman, P. A. (1993). **A Well-Behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Restraints for Deriving Atomic Charges: The RESP Model** *J. Phys. Chem.* 97, 10269–10280.

Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., DiNola, A., Haak, J. R. 1984 **Molecular dynamics with coupling to an external bath.** *J. Chem. Phys.* 81:3684–3690.

Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., and Hermans, J. (1981) **Intermolecular Forces.** (B. Pullmann, Ed.), pp. 331–342. *D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, The Netherlands.*

Berk H., David van der S., Erik L. (2010). **Gromacs User Manual version 4.5.4.** Royal Institute of Technology and Uppsala University, Sweden.

Brewer J. M., Tetley L., Richmond J., Liew F. Y., Alexander J. (1998) **Lipid Vesicle Size Determines the Th1 or Th2 Response to Entrapped Antigen.** *Immunol.* 161:4000-4007
Caffrey M (2003) **Membrane protein crystallization.** *J Struct Biol* 142: 108–132.

Cassone A., Casadevall A. (2012) **Recent progress in vaccines against fungal diseases.** *Current Opinion in Microbiology* 2012, 15:427–433

Chin C., Heijne G. von (2000) **Charge Pair Interactions in a Model Transmembrane Helix in the ER Membrane** *J. Mol. Biol* 303: 1-5

Clancy C. J., Nguyen M., Cheng S., Huang H., Fan G., Jaber R. A., Wingard J. R., Cline C., Nguyen M. H. (2008) **Immunoglobulin G Responses to a Panel of *Candida albicans* Antigens as Accurate and Early Markers for the Presence of Systemic Candidiasis.** *Journal of clinical microbiology* 46:1647–1654

- Correia-Pinto J. F., Csaba N., Alonso M. J. (2013) **Vaccine delivery carriers: Insights and future perspectives** *International Journal of Pharmaceutics* 440:27– 38
- Cox S. R., Williams D. E., (1981). **Representation of the Molecular Electrostatic Potential by a New Atomic Charge Model.** *Journal of the American Chemical Society* 2:304-323.
- Dan J. M., Levitz S.M.(2006) **Prospects for development of vaccines against fungal diseases.** *Drug Resistance Updates* 9:105–110
- Darden T., York D., Pederson L., **Particle mesh Ewald: An Nlog(N) method for Ewald sums in large systems** *J. Chem. Phys.* 98:10089
- Deol S. S., Bond P. J., CDomene C., Sansom M. S. P (2004) **Lipid-Protein Interactions of Integral Membrane Proteins: A Comparative Simulation Study** *Biophysical Journal* 87: 3737–3749
- Drummond C, Fong C (2000) **Surfactant self-assembly objects as novel drug delivery vehicles.** *Curr Opin Colloid Interface Sci* 4: 449–456
- Duan Y., Wu C., Chowdhury S., Lee M. C., Xiong G., Zhang W., Yang R., Cieplak P., Luo R., Lee T., Caldwell J., Wang J., Kollman P. (2003) **A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations.** *J Comput Chem.* 24(16):1999-2012.
- Ewald, P. P. 1921, *Ann. Phys.* 64:253–287.
- Freites J. A., Tobias D. J., Heijne G. von, White S. H. (2005) **Interface connections of a transmembrane voltage sensor.** *PNAS* 102:15059–15064
- Frézard F.(1999) **Liposomes: from biophysics to the design of Peptide vaccines** *Braz J Med Biol Res* 32: 181-189
- Henriksen-Lacey M., Christensen D., Bramwell V. W., Lindenstrøm T., Agger E. M., Andersen P., Perrie Y. (2010) **Liposomal cationic charge and antigen adsorption are important properties for the efficient deposition of antigen at the injection site and ability of the vaccine to induce a CMI response.** *Journal of Controlled Release* 145:102–108.
- Hess B., Bekker H., Berendsen H. J. C, Fraaije J. G. E. M. (1997) **LINCS: A Linear Constraint Solver for Molecular Simulations.** *Journal of Computational Chemistry, Vol. 18, No. 12:* 1463, 1472
- Hockney R.W., Eastwood J. W. (1988), **Computer Simulation Using Particles.** *Bristol, Adam Hilger*
- HogenEsch H. (2002) **Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants.** *Vaccine* 20:S34–S39
- Hwang M. J., Stockfish T. P., Hagler A. T. (1994) **Derivation of Class II Force Fields. 2. Derivation and Characterization of a Class II Force Field, CCF93, for the Alkyl Functional Group and Alkene Molecules.** *Journal of the American Chemical Society* 116:2515-2525
- Johansson A. C. V., Lindahl E. (2006) **Amino-Acid Solvation Structure in Transmembrane Helices from Molecular Dynamics Simulations** *Biophysical Journal* 91: 4450–4463

- Johansson A., Lindahl E., 2008. **Position-resolved free energy of solvation for aminoacids in lipid membranes from molecular dynamics simulations** *Proteins* 70:1332-1344.
- Jorgensen W. L., Chandrasekhar J., Madura J. D., Impey R. W., Klein, M. L. (1983). **Comparison of simple potential functions for simulating liquid water.** *J. Chem. Phys.* 79, 926–935.
- Kersten G. F. A., D. J.A. Crommelin (1995) **Liposomes and ISCOMS as vaccine Formulations.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1241:117-138
- Kirkwood J. G. (1935) **Statistical Mechanics of Fluid Mixtures.** *Chem. Phys.* 3:300-311
- Kumar S., Bouzida D., Swendsen R. H., Kollman, Rosenberg J.M. (1992) **The Weighted Histogram Analysis Method for Free-Energy Calculations on Biomolecules. I. The Method** *J. Comp. Chem.* 13:1011-1021.
- Luo G., Ibrahim A. S., Brad Spellberg B., Nobile C. J, Mitchell A. P., Fu Y. (2010) **Candida albicans Hyr1p Confers Resistance to Neutrophil Killing and Is a Potential Vaccine Target.** *The Journal of Infectious Diseases* 201:11,1718–1728
- MacCallum J. Bennett W. Tieleman D. 2008, **Distribution of Amino Acids in Lipid Bilayer from Computer Simulations,** *Biophysical Journal* 94:393-3404
- MacCallum J. L., Bennett W. F., Tieleman D. P. (2011) **Transfer of arginine into lipid bilayers is nonadditive.** *Biophysical Journal* 101 (1), 110-117
- Mackerell A. D. Jr. (2004) **Empirical Force Fields for Biological Macromolecules: Overview and Issues.** *Journal of Computational Chemistry.* 25: 1584-1604
- Mann J. F. S., Shakir E., Carter K. C., Mullen A. B., Alexander J., Ferro V. A. (2009) **Lipid vesicle size of an oral influenza vaccine delivery vehicle influences the Th1/Th2 bias in the immune response and protection against infection.** *Vaccine* 27:3643–3649
- Marcela P. Aliste, Justin L. MacCallum, and D. Peter Tieleman(2003) **Molecular Dynamics Simulations of Pentapeptides at Interfaces: Salt Bridge and Cation- π Interactions.** *Biochemistry* 42: 8976-8987
- Marrack P., McKee A. S., Munks M. W. (2009) **Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium.** *Nat Rev Immunol.* 9: 287–293
- Martínez L., Andrade R., Birgin E.G, Martínez M. J. 2009. **Packmol: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations.** *Journal of Computational Chemistry*, 30(13):2157-2164
- Mayer F.L., Duncan W. D., Hube B. (2013) **Candida albicans pathogenicity mechanisms.** *Virulence* 4:2, 119–128
- Morse P. M. (1929) **Diatomic molecules according to the wave mechanics. II. vibrational levels.** *Phys. Rev.* 34:57–64, 1929.
- Moyle P. M., Toth I. (2013) **Modern Subunit Vaccines: Development, Components and Research Opportunities.** *ChemMedChem* 8: 1–18
- Murphy, Kenneth P. (2012) **Janeway's Imuno Biology 8th ed.** *Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC*

- Nakanishi T., Kunisawa J., Hayashi A., Tsutsumi Y., Kubo K., Nakagawa S., Fujiwara H., Hamaoka T., Mayumi T. (1997) **Positively Charged Liposome Functions as an Efficient Immunoadjuvant in Inducing Immune Responses to Soluble Proteins.** *Biochemical and Biophysical Research communications* 240: 793–797
- O'Hagan D. T., Podda A. (2008) **MF59: A safe and potent oil in water emulsion adjuvant for influenza vaccines, which induces enhanced protection against virus challenge.** *Birkhäuser Advances in Infectious Diseases, Influenza Vaccines for the Future*: 221-244
- Oliveira, I.M.S.C., J.P. Neves Silva, E. Feitosa, E.F. Marques, E.M.S. Castanheira, and M.E.C.D. Real Oliveira (2012) **Aggregation behaviour of aqueous dioctadecyldimethylammonium bromide/monoolein mixtures: A multitechnique investigation on the influence of composition and temperature.** *Journal of Colloid and Interface Science* 374: 206-217.
- Pace C. N., Scholtz J. M. (1998) **A Helix Propensity Scale Based on Experimental Studies of Peptides and Proteins** *Biophysical Journal* 75: 422–427
- Pearse M. J., Drane D. (2005) **ISCOMATRIX adjuvant for antigen delivery.** *Advanced Drug Delivery Reviews* 57:465–474
- Peek L. J., Middaugh C. R., Berkland C. (2008) **Nanotechnology in vaccine delivery.** *Advanced Drug Delivery Reviews* 60:915–928
- Pitarch A., Abian J., Carrascal M., Sánchez M., Nombela C., Gil C. (2004) **Proteomics-based identification of novel *Candida albicans* antigens for diagnosis of systemic candidiasis in patients with underlying hematological malignancies.** *Proteomics* 4:3084–3106
- Reed S. G., Bertholet S., Colerand R. N., Friede M. (2008) **New horizons in adjuvants for vaccine development.** *Trends in Immunology*. 30:23-32
- Roux B. (1995) **The calculation of the potential of mean force using computer simulations.** *Computer Physics Communications* 91:275-282
- Schijns V. E. J. C (2000) **Immunological concepts of vaccine adjuvant activity** *Current Opinion in Immunology* 12:456–463
- Schrodinger L., (2010) **The PyMOL molecular graphics system, version 1.3r1.**
- Shepherd M.C., Poulter R. T. M., Sullivan P. A. (1985) ***Candida albicans*: Biology, Genetics, and pathogenicity.** *Ann. Rev. Microbiol.* 39:579-614
- Singh H., Raghava G.P.S. (2001) **Propred: Predication of HLA-DR binding sites.** *Bioinformatics* 17:1236–1237.
- Singh H., Raghava G.P.S. (2003) **ProPred1: prediction of promiscuous MHC Class-I binding sites.** *Bioinformatics* 19:1009–1014
- Storni T., Kündig T. M., Gabriela Senti G., Johansen P. (2005) **Immunity in response to particulate antigen-delivery systems.** *Advanced Drug Delivery Reviews* 57:333–355
- Strandberg E., Killian J. A. (2003) **Snorkeling of lysine side chains in transmembrane helices: how easy can it get?** *FEBS Letters* 544:69-73

- Tieleman D. P., Forrest L. R., Sansom M. S. P., Berendsen H. J. C. (1998) **Lipid Properties and the Orientation of Aromatic Residues in OmpF, Influenza M2, and Alamethicin Systems: Molecular Dynamics Simulations** *Biochemistry*, 37: 17554-17561
- Torosantucci A., Bromuro C., Chiani P., De Bernardis F., Berti F., Galli C., Norelli F., Bellucci C., Polonelli L., Costantino P., Rappuoli R., Cassone A. (2005) **A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens.** *JEM* 202:5, 597–606
- Torosantucci A., Bromuro C., Chiani P., De Bernardis F., Berti F., Galli C., Norelli F., Bellucci C., Polonelli L., Costantino P., Rappuoli R., Cassone A. (2005) **A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens.** *JEM* 202:5, 597–606
- Torrie G. M., Valleau J. P. (1977) **Nonphysical Sampling Distributions in Monte Carlo Free-Energy Estimation: Umbrella Sampling.** *J. Comput. Phys.* 23: 187 – 199.
- Toukmaji A. Y., Board J. A. Jr. (1996) **Ewald summation techniques in perspective: a survey.** *Computer Physics Communications* 95:73-92
- Ulmschneider J. P., Andersson M., Ulmschneider M. B. (2011) **Determining Peptide Partitioning Properties via Computer Simulation.** *J Membrane Biol.* 239:15–26
- van der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A. E., Berendsen H. J. C. (2005) **GROMACS: Fast, Flexible and Free** *J. Comp. Chem.* 26 :1701-1719
- Wack, A. and Rappuoli, R. (2005) **Vaccinology at the beginning of the 21st century.** *Curr. Opin. Immunol.* 17:411–418
- Wang J., Wang W., Kollman P.A., Case D. A. (2001) **Antechamber, An Accessory Software Package For Molecular Mechanical Calculations** *J. Am. Chem. Soc*
- Watson D. S, Endsley A. N., Huang L. (2012) **Design considerations for liposomal vaccines: Influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens.** *Vaccine* 30:2256– 2272
- Wimley W. C., Gawrisch K., Trevor P. Creamer T. P., White S. H. (1996) **Direct measurement of salt-bridge solvation energies using a peptide model system: Implications for protein stability.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 2985-2990
- Wolf M. G. , Hoefling M., Aponte-Santamaría C., Grubmüller H., Groenhof G., (2010) **g_membed: Efficient insertion of a membrane protein into an equilibrated lipid bilayer with minimal perturbation.** *Journal of Computational Chemistry*, 31(11):2169–2174
- Xin H., Cutler J. E. (2011) **Vaccine and Monoclonal Antibody That Enhance Mouse Resistance to Candidiasis.** *Clin. Vaccine Immunol.*, 18:1656–1667
- Xin H., Dziadek S., Bundle D. R., Cutler J. E. (2008) **Synthetic glycopeptide vaccines combining β -mannan and peptide epitopes induce protection against candidiasis.** *PNAS* 36: 13526–13531